

TABLE DES MATIERES

Table des matières.....	2
Liste des Figures	6
Liste des Tableaux	7
Liste des abréviations.....	8
Avant-propos	10
Introduction	11
1 Les muqueuses du TRF	11
1.1 Le tractus reproducteur féminin (TRF).....	11
1.1.1 Généralités sur le TRF et son rôle contre les pathogènes	11
1.1.2 Caractéristiques du cycle menstruel chez la femme	13
1.2 Système immunitaire local.....	14
1.2.1 Les muqueuses du TRF, une barrière naturelle.....	14
1.2.2 Immunité innée.....	15
1.2.3 Immunité spécifique.....	28
1.3 Régulations du système immunitaire par le cycle menstruel.....	30
1.3.1 Régulations cellulaires	30
1.3.2 Régulation des facteurs solubles.....	32
2 Le microbiote vaginal.....	33
2.1 Composition du microbiote vaginal.....	33
2.1.1 Le genre <i>Lactobacillus</i>	35
2.1.2 <i>Gardnerella vaginalis</i> et autres bactéries des microbiotes vaginaux de type IV .	36
2.2 Facteurs influençant le microbiote vaginal	37
2.2.1 Facteurs génétiques	37
2.2.2 Facteurs environnementaux.....	37
2.3 Impact du microbiote sur le système immunitaire et inversement	39
3 Le liquide séminal (LS).....	48
3.1 Composition et propriétés du LS.....	48
3.1.1 Composition biochimique.....	48
3.1.2 Propriétés biochimiques.....	51
3.2 Facteurs influençant le LS.....	52
3.2.1 Facteurs génétiques	52
3.2.2 Facteurs environnementaux.....	53
3.3 Impact du LS sur le système immunitaire	54
4 <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT), l'IST bactérienne majoritaire chez les jeunes femmes	62
4.1 Épidémiologie.....	62
4.2 Cycle de vie, physiopathologie et traitement.....	62
4.3 Réponse immunitaire à l'infection CT.....	66
4.3.1 Réponse innée	66
4.3.2 Réponse adaptative.....	70
4.3.3 Impact du microbiote sur l'infection CT et inversement	73

4.3.4	Impact du LS sur l'infection CT	75
4.4	Une IST fréquente en co-infection.....	76
4.4.1	Epidémiologie	76
4.4.2	Mécanismes impliqués dans la co-infection CT/VIH-1.....	77
5	Modèles expérimentaux d'étude des muqueuses du TRF.....	81
5.1	Modèles <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	81
5.2	Modèles <i>in vivo</i> : intérêt du macaque cynomolgus.....	84
5.2.1	Généralités sur l'espèce	85
5.2.2	Physiologie du macaque cynomolgus.....	85
5.2.3	Réponse à l'infection CT	90
	Hypothèses et objectifs	92
	Hypothèses.....	92
	Objectifs.....	95
	Résultats	98
1	Etude <i>in vitro</i> de l'impact du LS sur l'infection CT et sur l'inflammation... 98	
1.1	Introduction et Objectifs	98
1.2	Résultats	98
1.3	Article 1	100
2	Caractérisation de l'inflammation génitale et systémique en condition physiologique <i>in vivo</i>.	122
2.1	Introduction et Objectifs	122
2.2	Résultats	123
2.3	Article 2	125
3	Etude <i>in vivo</i> de l'impact du LS sur l'inflammation en condition physiologique ou dans un contexte d'infection CT.....	147
3.1	Introduction et Objectifs	147
3.2	Résultats	147
3.3	Article 3	149
4	Etude <i>in vitro</i> de l'impact de la composition du microbiote vaginal sur l'inflammation induite par CT.	178
4.1	Introduction et Objectifs	178
4.2	Matériels et méthodes.....	178
4.3	Résultats	182
4.4	Discussion	191
4.5	Perspectives	195
	Discussion générale.....	198
1	Caractérisation de l'inflammation au niveau du TRF	199
1.1	En condition physiologique	200
1.2	Au cours de l'infection CT	203
2	Rôle des facteurs de l'environnement au niveau du TRF	205
2.1	Le liquide séminal	205
2.1.1	En condition physiologique	205
2.1.2	Au cours de l'infection CT.....	208
2.2	Le microbiote vaginal	210

2.2.1	En condition physiologique	210
2.2.2	Au cours de l'infection CT.....	212
3	Comparaison des modèles utilisés	214
3.1	Modèle <i>in vitro</i> vs <i>in vivo</i>	214
3.2	Espèce humaine vs modèle macaque	217
	Conclusion et perspectives	219
	Bibliographie.....	224
	Annexes	248
	Annexe 1 : Revue 1	248
	Annexe 2 : Article 4.....	286
	Annexe 3 : Revue 2	327
	Annexe 4 : Résumés de thèse	353

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du tractus reproducteur féminin (TRF).	11
Figure 2 : Histologie du TRF.	12
Figure 3 : Le cycle menstruel.	13
Figure 4 : Composants principaux de l'immunité innée au niveau muqueux.	16
Figure 5 : Etapes de la circulation des neutrophiles et sous-populations de neutrophiles.	25
Figure 6 : Fonctions des neutrophiles.	27
Figure 7 : Modifications au niveau des muqueuses du TRF au cours du cycle menstruel.	31
Figure 8 : Composition du microbiote vaginal.	34
Figure 9 : Principales propriétés de bactéries du microbiote vaginal.	36
Figure 10 : Facteurs influençant la composition du microbiote vaginal.	38
Figure 11 : Impact du microbiote vaginal au niveau des muqueuses du TRF.	40
Figure 12 : Interaction entre les neutrophiles et le microbiote au niveau des muqueuses.	43
Figure 13 : Origine, composition et principales fonctions du liquide séminal. ...	49
Figure 14 : Facteurs influençant la composition du liquide séminal.	53
Figure 15 : Impact du sperme au niveau des muqueuses du TRF.	55
Figure 16 : Modulation de la transmission sexuelle des virus à travers l'épithélium du TRF par les composants du LS.	59
Figure 17 : Cycle de réplication de <i>Chlamydia trachomatis</i>.	64
Figure 18 : Maladie, épidémiologie et pathogenèse dues à <i>C. trachomatis</i>.	65
Figure 19 : Rôle des différents PRR impliqués dans la reconnaissance de CT.	67
Figure 20 : Pathogenèse de l'infection par <i>C. trachomatis</i>.	69
Figure 21 : Interactions entre <i>C. trachomatis</i>, le microbiote vaginal et le système immunitaire.	74
Figure 22 : Mécanismes potentiels impliqués dans la co-infection <i>C. trachomatis</i>/VIH-1.	80
Figure 23 : Comparaison de différents modèles expérimentaux <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>.	83
Figure 24 : Comparaison des principales populations du système immunitaire au niveau sanguin et dans le TRF, chez la femme et le macaque cynomolgus.	87
Figure 25 : Le microbiote vaginal chez les femelles macaques cynomolgus.	89
Figure 26 : Schéma des hypothèses testées au cours de la thèse.	94
Figure 27 : Schéma du modèle expérimental <i>in vitro</i>.	180
Figure 28 : Expression des cytokines par les cellules A2EN.	183
Figure 29 : Cellules A2EN infectées par <i>C. trachomatis</i> (CT).	184
Figure 30 : Impact des surnageants de culture des cellules A2EN sur le phénotype des neutrophiles issus du sang périphérique.	187

Figure 31 : Impact des surnageants de culture des cellules A2EN sur la survie des neutrophiles issus du sang périphérique.....	189
Figure 32 : Impact des surnageants des cellules A2EN sur la transduction du VIH-1.....	190
Figure 33 : Effet de <i>L. crispatus</i> vivant ou inactivé sur les cellules A2EN.	192
Figure 34 : Résumé des principaux résultats obtenus <i>in vivo</i> au cours de la thèse.	202
Figure 35 : Résumé des principaux résultats obtenus <i>in vitro</i> au cours de la thèse.....	207
Figure 36 : Schéma des principales perspectives de la thèse.	221

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition et phénotype des cellules immunitaires des muqueuses du TRF.....	23
Tableau 2 : Fonction des principaux composants du liquide séminal.	50
Tableau 3 : Principales stratégies de prévention du VIH-1 existant à ce jour chez les femmes.	77
Tableau 4 : Effet de différentes cytokines sur l'infection VIH-1.....	78
Tableau 5 : Viabilité des cellules A2EN et valeur de pH des surnageants des cellules dans les différentes conditions expérimentales après 24 h de culture (n=4).	184
Tableau 6 : Impact des différentes conditions expérimentales sur le phénotype des neutrophiles <i>in vitro</i>.....	201
Tableau 7 : Impact des différentes conditions expérimentales sur les fonctions des neutrophiles <i>in vitro</i>.....	203

LISTE DES ABREVIATIONS

AMP	Peptide Antimicrobien
APC	Cellule Présentatrice d'Antigène
BV	Vaginose Bactérienne
CD	Cluster de Différentiation
CPAF	<i>Chlamydia Protéase-Like Activating Factor</i>
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CXCL	Ligand au Motif C-X-C
CXCR	Récepteur au Motif C-X-C
DC	Cellule Dendritique
EB	Corps Élémentaire
FSH	Hormone Folliculo-Stimulante
G-CSF	Facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes
GM-CSF	Facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes et Macrophages
GMP	Progéniteur Commun Granulocyte Monocyte
HBD	Beta Défensine Humaine
HDAC	Histone Désacétylase
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR Isotype
IDO	Indoleamine 2,3 Dioxygénase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukine
ISG	Gène Stimulé par L'interféron
IST	Infections Sexuellement Transmissibles
KO	<i>Knock Out</i>
LC	Cellule de Langerhans
LGV	Lymphogranulomatose Vénérienne
LH	Hormone Lutéinisante
LPS	Lipopolysaccharide
LS	Liquide Séminal
MIF	Facteur Inhibant la Migration des Macrophages
MMP	Métalloprotéase
MOI	Multiplicité d'Infection
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
MPO	Myéloperoxydase
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
NK	Cellule Tueuse Naturelle
PAMP	Motifs Moléculaires Associés aux Agents Pathogènes
PAP	Phosphatase Acide Prostatique
PGE	Prostaglandine E

Liste des abréviations

pIgR	Récepteur aux Immunoglobulines Polymeriques
PNH	Primate Non Humain
PRR	Récepteur de Reconnaissance de Motifs Moléculaires
PSA	Antigène Spécifique de Prostate
RB	Corps Réticulé
ROS	Espèce Réactive de l'Oxygène
SCFA	Acide Gras à Chaine Courte
SEVI	Enhancer d'infection virale issu du sperme
SLPI	Inhibiteur de Protéase Sécrétoire Leucocytaire
TGF	Facteur de Croissance Transformant
TLR	Récepteur de Type Toll
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRF	Tractus Reproducteur Féminin
VEGF	Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Rapport-Gratuit.com

AVANT-PROPOS

Depuis le début des années 2000, une recrudescence des infections sexuellement transmissibles (IST) est apparue dans plusieurs pays d'Europe de l'Ouest, dont la France, alors que plusieurs d'entre elles étaient quasiment éradiquées dans ces pays¹. En particulier, l'incidence des infections par *Chlamydia trachomatis* (CT), a particulièrement augmenté ces dernières années, chez les femmes et les hommes, et dans toutes les régions du globe². En 2017, la Chlamydie était l'IST bactérienne la plus fréquente chez les jeunes femmes d'Europe de l'Ouest, malgré la disponibilité de traitements antibiotiques efficaces ; la transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme comptait pour près de la moitié des cas de nouvelles contaminations³. Il y a donc un besoin urgent d'améliorer les moyens de prévention contre ces IST.

Les muqueuses du tractus reproducteur féminin (TRF) sont la première ligne de défense contre les IST : elles forment une barrière qui empêche la pénétration des pathogènes dans l'organisme. Différents facteurs du microenvironnement local, en particulier l'inflammation, jouent un rôle dans le contrôle de ces infections : ces facteurs peuvent favoriser l'acquisition d'IST, d'autres la défavorisent, soit de manière directe, soit de manière indirecte (par exemple en modifiant l'inflammation). L'impact de certains de ces facteurs sur l'inflammation locale n'est que partiellement décrit, et très peu de choses sont connues sur l'interaction des différents facteurs de l'environnement du TRF, que ce soit dans un contexte physiologique ou pathologique en présence d'IST telle que CT.

Parmi ces facteurs, le microbiote vaginal, le liquide séminal (LS) ou encore l'inflammation jouent un rôle au niveau local sur la susceptibilité aux IST : en fonction de leur composition qualitative et quantitative, ils peuvent augmenter ou diminuer le risque d'acquisition d'IST. Une meilleure compréhension des interactions entre ces facteurs au niveau systémique et surtout au niveau des muqueuses du TRF est donc nécessaire à la mise en place de stratégies de prévention efficaces contre les IST. C'est pourquoi au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'impact de différents facteurs de l'environnement du TRF sur l'immunité d'une part, et d'autre part sur le contrôle d'IST au niveau des muqueuses du TRF.

INTRODUCTION

Les muqueuses du TRF constituent la première barrière naturelle de l'organisme, protégeant le milieu intérieur des agressions de l'environnement⁴. Dans un premier temps, nous verrons donc les caractéristiques des muqueuses du TRF, qui leur confèrent ce rôle de barrière, puis nous détaillerons les cellules immunitaires présentes et qui jouent un rôle dans la réponse à des agressions au niveau de la muqueuse.

1 LES MUQUEUSES DU TRF

1.1 Le tractus reproducteur féminin (TRF)

1.1.1 Généralités sur le TRF et son rôle contre les pathogènes

Le TRF est divisé en deux parties, aux structures différentes (Figure 1)^{5,6} :

- Le tractus haut, comprenant les ovaires, les trompes de Fallope, l'utérus et l'endocol.
- Le tractus bas, comprenant l'exocol, le vagin et la vulve.

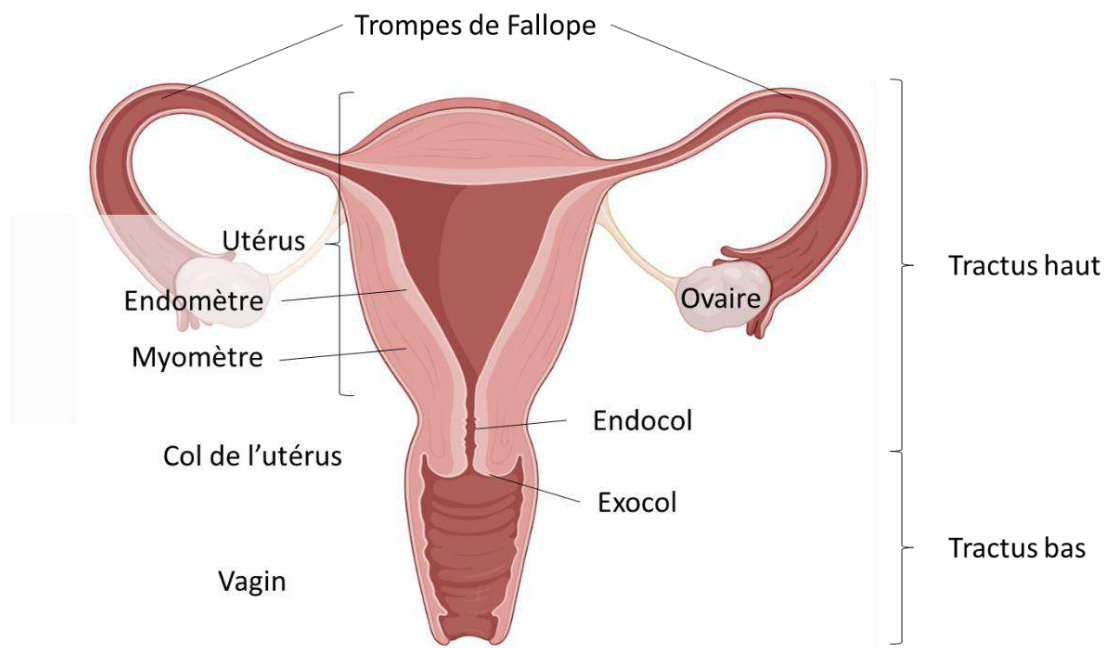


Figure 1 : Structure du tractus reproducteur féminin (TRF). Créée sur Biorender.com.

Le tractus bas est recouvert d'un épithélium stratifié, squameux (de type malpighien) et non kératinisé, tandis que le tractus haut est recouvert d'un épithélium simple cylindrique

composé de cellules glandulaires et de cellules ciliées. L'épithélium repose sur un tissu conjonctif appelé *lamina propria*, riche en cellules immunitaires et en fibroblastes, qui se trouvent dans une matrice extracellulaire riche en fibres de collagènes et en élastine (Figure 2)⁷. L'épithélium est en contact avec la lumière du tractus génital féminin.

La muqueuse utérine possède une architecture particulière, l'endomètre, formé d'une monocouche de cellules épithéliales reposant sur une couche de tissu conjonctif (stroma) fortement vascularisé. Après la puberté, la structure de l'endomètre varie selon les phases du cycle menstruel. L'utérus et l'endocol sont riches en glandes sécrétrices de mucus⁸.

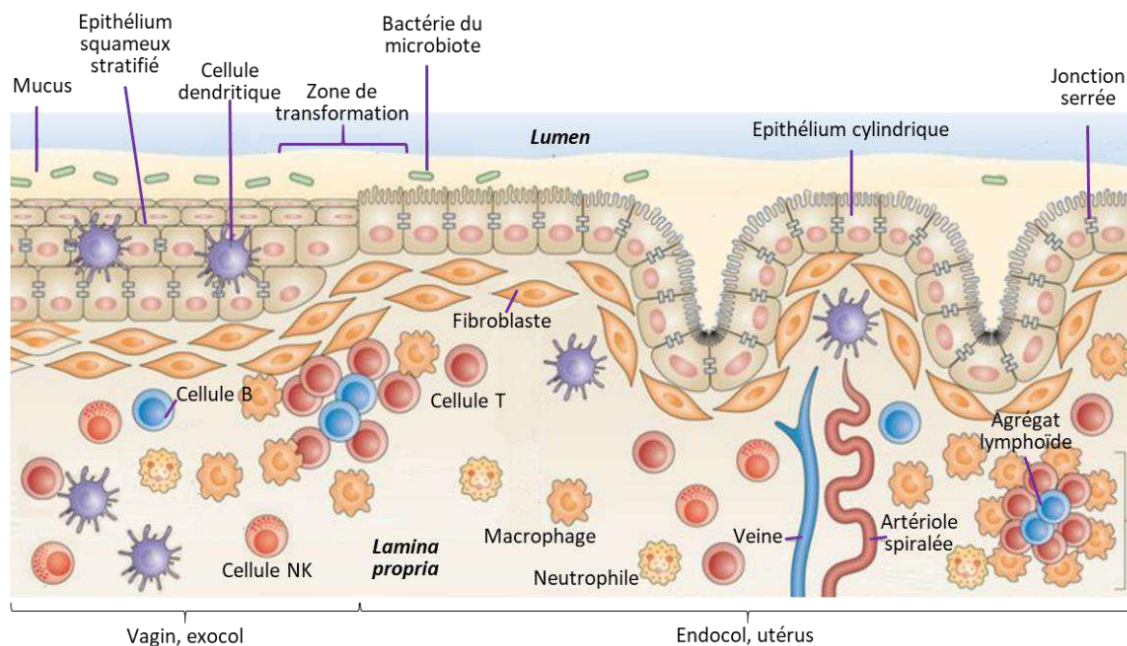


Figure 2 : Histologie du TRF. Le tractus bas est protégé par un épithélium pavimenteux stratifié. Le tractus haut est lui recouvert d'un épithélium cylindrique monocouche. La zone de transition entre le tractus bas et haut est appelée zone de transformation. Au-dessus de la surface épithéliale, dans la lumière du tractus, se trouvent du mucus, des facteurs solubles, et au niveau vaginal, un microbiote. Sous l'épithélium, une *lamina propria*, riche en fibroblastes et en cellules immunitaires, est présente. La zone de transformation contient un nombre plus élevé de cellules immunitaires que le reste du TRF. Dans l'endomètre, la muqueuse est particulièrement vascularisée et les cellules immunitaires forment des agrégats lymphoïdes. Modifiée à partir de Wira et al, 2015⁹.

La zone de transition entre les tractus haut et bas au niveau du col est appelée zone de transformation. Cette zone est immunologiquement active et constitue un site préférentiel d'entrée dans l'organisme pour des pathogènes tel que le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) ou *Chlamydia trachomatis* (CT)^{10,11}.

1.1.2 Caractéristiques du cycle menstruel chez la femme

L'utérus subit des changements cycliques continus de la puberté à la ménopause. Chaque cycle menstruel dure environ 28 jours. Il est contrôlé par des hormones, et s'accompagne d'un cycle ovarien concomitant (Figure 3).

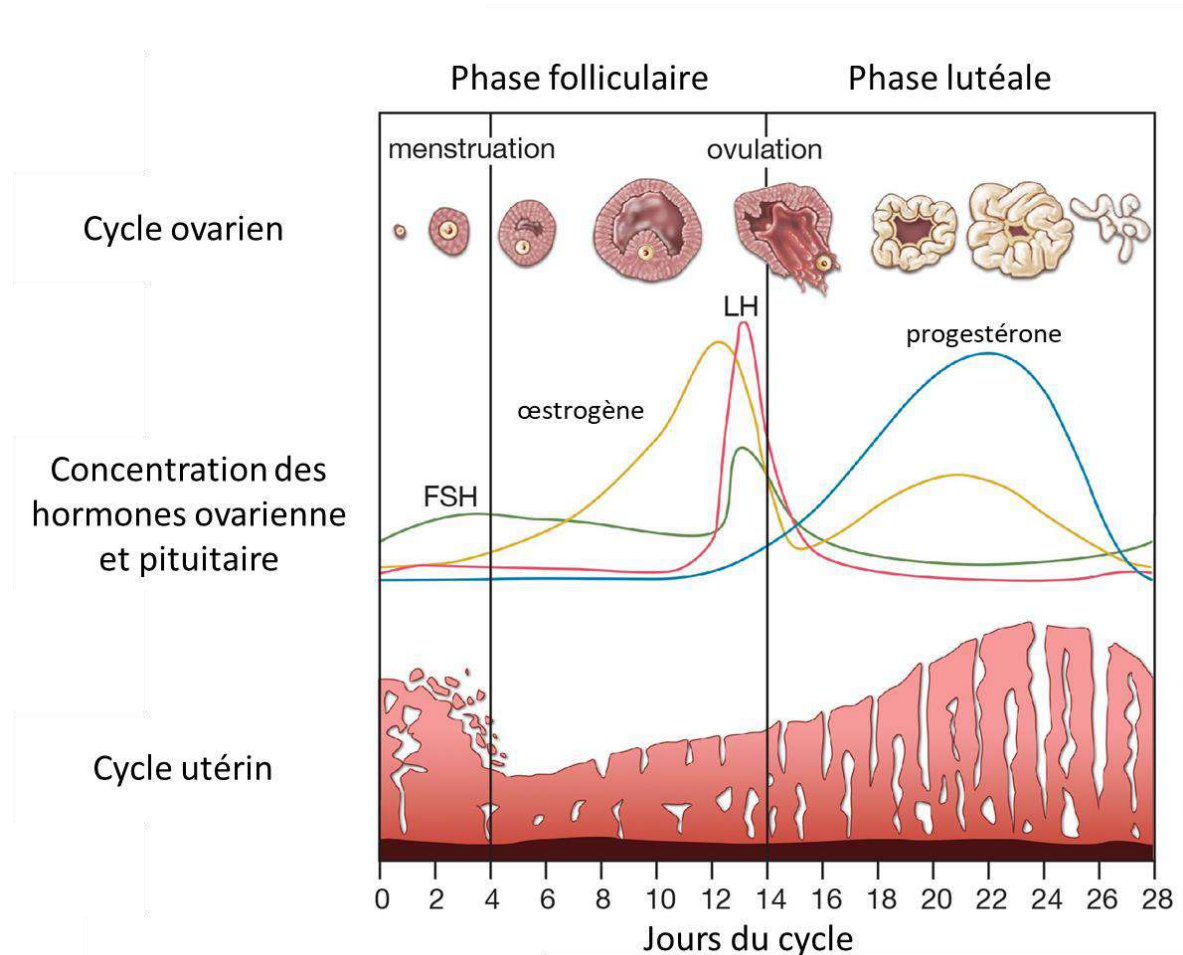


Figure 3 : Le cycle menstruel. Le cycle menstruel est divisé en plusieurs phases, orchestrées par différentes hormones. Au cours de ces phases, des modifications de la muqueuse utérine et au niveau de l'ovaire permettent d'assurer la fonction de reproduction. Modifiée à partir de www.britannica.com/science/menstruation.

Le cycle menstruel est divisé en 3 phases : les menstruations, la phase proliférative (ou phase folliculaire pour le cycle ovarien) et la phase sécrétoire (ou phase lutéale pour le cycle ovarien)⁹. La phase folliculaire est caractérisée par une augmentation croissante de la concentration d'œstrogène produit par un follicule ovarien mature. Cette production d'œstrogène est induite par l'hormone folliculo-stimulante (FSH), sécrétée par l'hypophyse.

Elle entraîne la prolifération de l'endomètre utérin. Deux jours avant l'ovulation, le niveau d'œstrogène est maximal et entraîne un rétrocontrôle positif au niveau de l'hypophyse, permettant un pic de sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH). Ce dernier permet la libération de l'ovocyte du follicule ovarien, puis les concentrations de LH, de FSH et d'œstrogène diminuent. Lors de la phase sécrétoire, le corps jaune au sein de l'ovocyte produit de la progestérone et de l'œstrogène. Sous l'effet de ces hormones, l'endomètre se différencie et atteint sa maturité. Le stroma conjonctif, les glandes exocrines et les artères qui irriguent l'endomètre sont le siège de diverses transformations, assurant la réceptivité de l'endomètre pour l'implantation d'un éventuel embryon¹². En absence de fécondation 7 à 10 jours après l'ovulation, le corps jaune est dégradé, les niveaux de progestérone et d'œstrogène diminuent ce qui induit les menstruations. Ces changements cycliques au niveau du TRF affectent également le système immunitaire, avec des modifications des facteurs solubles sécrétés, ou des cellules immunitaires⁹.

1.2 Système immunitaire local

Le système immunitaire des muqueuses du TRF assure la première ligne de défense contre les IST.

1.2.1 Les muqueuses du TRF, une barrière naturelle

Les muqueuses génitales forment une barrière physique empêchant les pathogènes de pénétrer dans l'organisme¹³. Des brèches dans l'épithélium peuvent favoriser l'entrée des pathogènes au sein de la muqueuse. Au niveau du tractus haut, les cellules épithéliales peuvent former des jonctions serrées, assurant le maintien de l'intégrité de la monocouche¹⁴. Une couche de mucus recouvre l'épithélium du TRF, et permet de "piéger" les microorganismes avant qu'ils n'atteignent l'épithélium¹⁵. Le mucus est composé de mucines (MUC), glycoprotéines de haut poids moléculaire¹⁶. Ces glycoprotéines peuvent être libres dans l'espace extracellulaire (MUC5/6) et former une matrice de gel épais, ou au contraire liées à la membrane des cellules épithéliales (MUC1/16). Les mucines sont différenciellement exprimées dans les compartiments du TRF : MUC 1, 4, 5AC, 5B et 6 sont exprimées au niveau de l'exocol, MUC 1 et 4 par les épithéliums ectocervicaux et vaginaux, tandis que dans l'endomètre et les trompes de Fallope, MUC 1 est la principale mucine retrouvée¹⁷. Les cellules épithéliales

du tractus haut expriment également des récepteurs aux immunoglobulines polymériques (pIgR) permettant la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) dans la lumière du tractus. Elles pourraient par ailleurs participer à la présentation antigénique à des lymphocytes T^{18,19}. Au niveau vaginal, les conditions d'oxygénation (environnement microaérophile), de température et surtout de pH (acide), restreignent la croissance de la plupart des microorganismes²⁰.

1.2.2 Immunité innée

L'immunité innée permet à l'organisme de répondre de manière immédiate contre une infection ou une irritation de la muqueuse du TRF (Figure 4). L'immunité innée assure de nombreuses fonctions au niveau du TRF : elle participe à la réponse immunitaire face au microbiote, à la protection contre les IST ou encore à la régulation du cycle menstruel utérin²¹.

1.2.2.1 Expression et fonctions des PRR

Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) sont des récepteurs du système immunitaire inné, capables de reconnaître des motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP). Il existe plusieurs familles de récepteurs, dont les récepteurs membranaires de type Toll (TLR), intracellulaires de type Nod (NLR) ou encore cytosoliques de type Rig-I (RLR). Chez l'Homme, 10 TLR numérotés de 1 à 10 ont été identifiés. La famille des NLR compte 22 membres répartis en 4 sous-familles en fonction de la structure de leur domaine N-terminal : NLRA, NLRB, NLRC et NLRP²³. La famille des RLR compte à ce jour trois membres : RIG-I, MDA5 et LGP2. Les PRR sont exprimés par des cellules épithéliales, des fibroblastes ou des cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules dendritiques (DC) ou des lymphocytes B, T ou tueuses naturelles (NK)²². RIG-1 est exprimé de manière quasi ubiquitaire²⁴. Les muqueuses du TRF expriment une variété de TLR^{25,26}. Les ARNm des TLR1 à 9 sont exprimés dans les différents compartiments du TRF, mais des études immunohistologiques, montrent en revanche une disparité de l'expression des TLR1 à 10 dans les différents tissus du TRF²⁷. Ces TLR sont exprimés par les cellules épithéliales et/ou par les cellules immunitaires résidentes. Les mutations génétiques de plusieurs NLR (NALP7 ou encore NLRP5) ont été associées à des problèmes de santé reproductive²³, ce qui indique qu'ils jouent un rôle au niveau du TRF. La stimulation de ces PRR par leur ligand

respectif déclenche une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription qui augmente l'expression de gènes immunomodulateurs. Ce processus conduit généralement à la sécrétion de cytokines et de chimiokines²⁸, ou à la sécrétion de composés antimicrobiens²⁹.

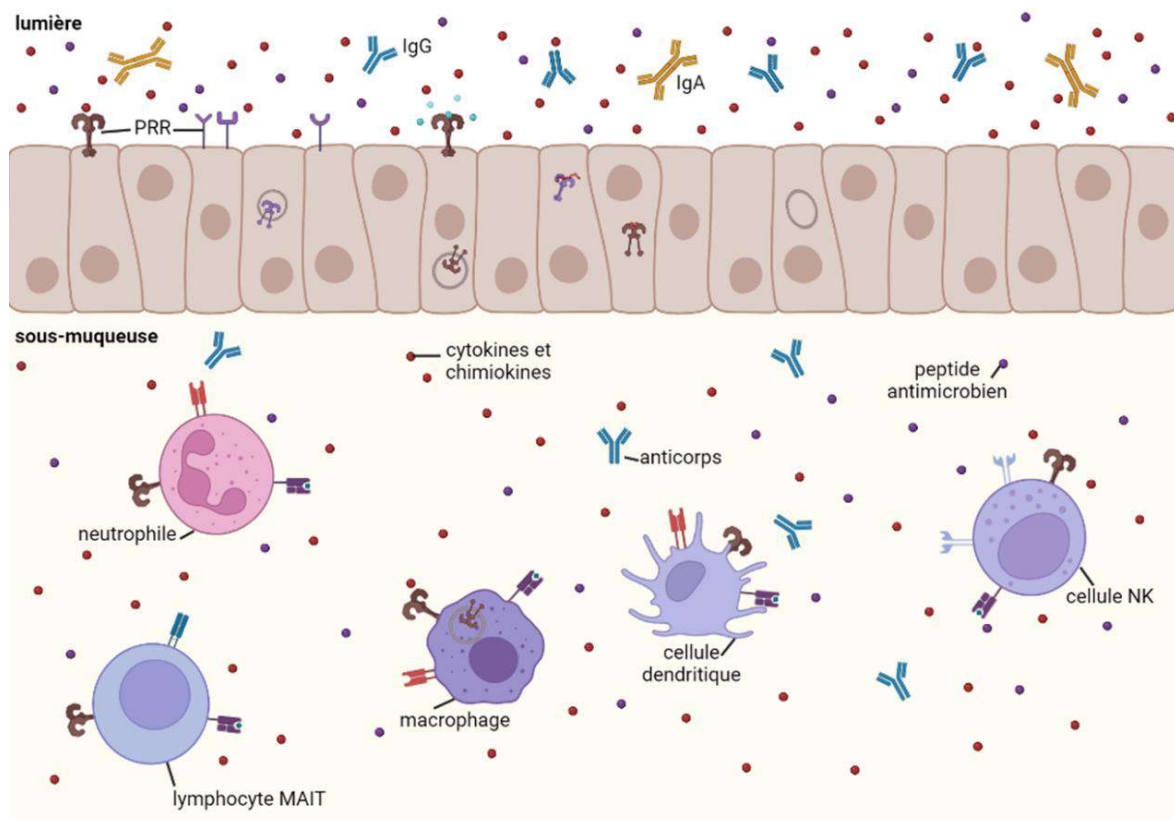


Figure 4 : Composants principaux de l'immunité innée au niveau muqueux. Les cellules épithéliales des muqueuses constituent une première barrière physique contre les pathogènes. Les cellules tueuses naturelles (NK), les neutrophiles, les cellules dendritiques ou encore les macrophages font partie des cellules immunitaires innées. Les différentes cellules expriment des récepteurs de reconnaissance de motifs associés à des pathogènes (PRR), les rendant capables d'y répondre. Au cours de la réaction inflammatoire, les cellules produisent des cytokines et chimiokines, permettant l'orchestration de la réponse immunitaire. Par ailleurs, les cellules immunitaires produisent d'autres facteurs solubles tels que des peptides ou des protéines aux fonctions antimicrobiennes. Créée sur Biorender.com.

1.2.2.2 Les facteurs solubles

Cytokines et Chimiokines

Les cytokines et les chimiokines jouent un rôle important dans l'immunité innée puisqu'elles permettent de transmettre des signaux entre cellules, et ainsi d'orchestrer la réponse immunitaire. Les principales cytokines et chimiokines intervenant dans l'orchestration des réponses immunitaires et dans le contrôle des IST au niveau du TRF seront détaillées ici³⁰.

Interférons

Les interférons (IFN) sont des acteurs majeurs de la réponse innée antivirale et jouent un rôle immunorégulateur. Il existe trois groupes d'interférons, qui se distinguent en fonction du récepteur auquel ils se lient, et parmi ceux-ci, le rôle des IFN de type I et II a été le mieux caractérisé. Ils sont majoritairement produits par différentes cellules du système immunitaire mais peuvent être également produits par les cellules épithéliales ou les fibroblastes par exemple³¹. Après liaison sur leur récepteur, les interférons agissent sur de très nombreux types cellulaires (cellules immunitaires, épithéliales, endothéliales, stromales, ...), et induisent l'expression de gènes spécifiques (ISG). Les principaux ISG codent des molécules antivirales et sont à l'origine de différents effets sur les réponses immunitaires innées et adaptatives. Les IFN de type I (ex : IFN- α , β et ϵ) sont importants pour répondre à des infections virales ou bactériennes au niveau du TRF³². Les IFN de type I sont majoritairement produits par des cellules immunitaires innées pour l'IFN- α , et les fibroblastes pour l'IFN- β ^{32,33}. Ils se lient au récepteur de l'IFN- α . Ils peuvent agir à différentes étapes (entrée, réplication, ...) et limitent ainsi la multiplication des pathogènes intracellulaires. Contrairement aux IFN- α et - β , dont l'expression est quasi constitutive et rapidement induite en réponse à la détection d'un pathogène, l'IFN- ϵ est exprimé uniquement dans certains tissus³⁴. Au niveau du TRF, l'IFN- ϵ est exprimé de manière constitutive par les cellules épithéliales. Au niveau des fluides vaginaux, des IFN de type II tels que l'IFN- γ sont aussi présents³⁵. L'IFN- γ est principalement synthétisé par les lymphocytes, mais est aussi sécrété par les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages)³⁶. Il se lie au récepteur de l'IFN- γ et joue un rôle semblable aux cytokines, permettant notamment la régulation de la présentation antigénique par les macrophages et les cellules dendritiques. Il est important dans la

résolution de nombreuses ISTs^{37,38}. Les interférons de type III (IFN λ) sont également produits par de nombreux types cellulaires, mais sont plutôt spécifiques des muqueuses. On les retrouve au niveau du TRF où ils sont produits notamment par les cellules dendritiques³⁹ et participent à la protection des muqueuses du TRF contre des infections virales ou bactériennes tout en assurant une tolérance à l'interface avec le milieu extérieur⁴⁰⁻⁴³.

Cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires augmentent la réponse inflammatoire en stimulant les cellules immunitaires ou en induisant leur maturation. Par exemple, le Facteur de Nécrose Tumorale (TNF), l'interleukine 6 (IL-6) ou encore l'IL-1 font partie des cytokines pro-inflammatoires. En conditions physiologique, la concentration des cytokines pro-inflammatoires varie en fonction des différents compartiments du TRF. Par exemple, l'expression d'IL-1 β , IL-6, IL-18 est supérieure au niveau de l'utérus par rapport au col⁴⁴. Au niveau des fluides cervico-vaginaux, la concentration d'IL-1, IL-6, IL-12 ou IL-18 est plus importante que celle d'IL-15, IL-17 ou TNF α ^{45,46}. Au niveau du TRF, ces différentes cytokines peuvent être sécrétées par les cellules immunitaires, stromales ou épithéliales, en réponse à des stimuli comme le lipopolysaccharide (LPS) ou des infections virales. Ces cytokines agissent sur de nombreux types cellulaires et assurent des fonctions variées. Le rôle des cytokines le mieux décrit est rapporté ici de manière non exhaustive (pour revue, voir Kany et al, 2019)⁴⁷. Le TNF α , produit majoritairement par les monocytes/macrophages, induit l'activation de NF- κ B, l'activation et la maturation des cellules présentatrices d'antigènes et stimule la production de cytokines et chimiokines par les leucocytes. L'IL-6 est majoritairement produit par les monocytes/macrophages et les lymphocytes en réponse à une stimulation antigénique ou cytokinique. Il agit en synergie avec le TNF α sur l'induction de NF- κ B, et favorise l'activation des réponses immunitaires adaptatives. Les cytokines de la famille de l'IL-1 sont majoritairement produits par la lignée myéloïde. Ils favorisent la régulation de production de cytokines (tels que l'IL-1, IL-8, IFN- γ , ...), les fonctions des cellules de la lignée myéloïde et l'activation des réponses immunitaires adaptatives⁴⁸.

Cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires diminuent les réponses immunitaires innée et adaptative. Le facteur de croissance transformant (TGF), le facteur inhibant la migration des macrophages (MIF), IL-4, ou l'IL-10 par exemple, font partie des cytokines anti-inflammatoires. Au niveau des fluides cervicaux, la concentration de MIF et d'IL-1RA est plus importante que celle d'IL-10, d'IL-4 ou de TGF β ^{45,46,49,50}. Ces différentes cytokines peuvent être sécrétées et agir sur de nombreux types cellulaires et elles assurent des fonctions variées. Le rôle des principales cytokines anti-inflammatoires qui agissent au niveau du TRF est décrit ci-après⁴⁷. MIF est un facteur majoritairement produit par les lymphocytes T. Il inhibe l'activation et les fonctions des macrophages. Il pourrait avoir un rôle particulier dans le processus d'implantation foetale⁴⁹. L'IL-1RA est une cytokine qui a une action anti-inflammatoire en entrant en compétition avec l'IL-1 pour la fixation sur son récepteur. Elle est notamment synthétisée en cas de forte inflammation et permet de moduler l'action de l'IL-1. L'IL-10 est une cytokine immunorégulatrice qui peut limiter la production de cytokines et l'expansion de lymphocytes T. Elle est présente en plus forte concentration au niveau de l'utérus. Elle peut être produite par une grande variété de cellules, dont les macrophages de type M2, les lymphocytes T, les cellules dendritiques (DC). Le TGF β est notamment produit par les macrophages. C'est une puissante cytokine immunomodulatrice, qui induit les lymphocytes T régulateurs (Treg), inhibe la prolifération des lymphocytes T et l'activation des macrophages.

Chimiokines

Les chimiokines sont des chimioattractants, qui permettent le recrutement de cellules immunitaires au site inflammatoire. Les chimiokines sont des ligands classés en quatre familles selon leur structure, le nombre et la position des résidus cystéines en N-terminal : les alpha (CXC), bêta (CC), delta (CX3C) et gamma (XC) chimiokines. Les différentes classes de chimiokines agissent en lien avec un récepteur cellulaire. La classification des récepteurs aux chimiokines correspond à la classification de leur ligand (par exemple CXCL8 peut se fixer sur CXCR1 ou CXCR2). De nombreuses chimiokines sont exprimées au niveau des tissus du TRF⁵¹. Au niveau des fluides vaginaux, la concentration de CXCL8 et CXCL10 est plus élevée que celle de CCL2⁴⁵. L'IL-8 ou CXCL8 est une chimiokine majoritairement produite

par les cellules épithéliales ou endothéliales. Elle est impliquée dans le recrutement de neutrophiles et de macrophages aux sites inflammatoires^{47,52}. CXCL10 est sécrétée par de nombreux types cellulaires (monocytes, cellules endothéliales ou fibroblastiques), notamment en réponse à l'IFN γ , et favorise le recrutement de leucocytes au site inflammatoire⁵³.

Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont capables de stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire. Par exemple, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est retrouvé en forte concentration dans les différents compartiments du TRF. Cette protéine intervient dans l'angiogenèse et régule la vascularisation de l'endomètre utérin au cours du cycle menstruel^{54,55}. Le facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF) et le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) sont deux autres facteurs de croissance présents au niveau du TRF. Ils sont produits par des nombreuses cellules immunitaires, endothéliales, ou encore fibroblastiques et affectent un grand nombre de cellules immunitaires. La quantité de G-CSF est plus importante que celle de GM-CSF au niveau des fluides vaginaux⁴⁵. Au niveau de la moelle osseuse, le GM-CSF induit la production de monocytes et de granulocytes à partir d'une cellule souche, alors que le G-CSF induit uniquement la production de granulocytes. Ces deux facteurs de croissance ont également un impact sur l'expression de marqueurs de surface des neutrophiles et ont un impact sur leur recrutement et leur survie^{56,57}.

Autres facteurs solubles (anticorps, peptides antimicrobiens...)

Les peptides antimicrobiens (AMP) sont des acteurs importants dans la lutte contre les IST, de par leur forte concentration au niveau des fluides vaginaux²¹. Il existe deux grandes familles de peptides antimicrobiens : les défensines (HBD) et les protéines au motif WAP (whey acidic protein). Les défensines sont des peptides cationiques, produites par différentes cellules immunitaires (neutrophiles, lymphocytes B, cellules NK, ...), ou par des cellules épithéliales. Deux groupes de défensines sont retrouvées au niveau du TRF, les α -défensines (majoritairement produites par les neutrophiles et les cellules épithéliales vaginales) et les β -défensines (majoritairement produites par les cellules épithéliales

vaginales)⁵⁸. Elles ont des propriétés antimicrobiennes larges, capables de cibler les bactéries Gram (-) et Gram (+), ainsi que certains champignons. Leur structure, amphiphile, peut s'insérer dans la membrane des micro-organismes et la rendre perméable. Ce sont également des chimioattractants. Les bêta-défensines induisent le recrutement de cellules T CD4⁺ mémoires, de monocytes, de macrophages et de neutrophiles et induisent la maturation de cellules dendritiques et des mastocytes⁵⁹. Parmi les protéines au motif WAP, la protéine SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor), l'élafine et dans une moindre mesure, la lactoferrine, sont présentes dans l'ensemble des muqueuses du TRF²¹. Ces peptides antimicrobiens présentent une activité antimicrobienne bactéricide et/ou bactériostatique, de manière directe ou indirecte. SLPI est par exemple un inhibiteur de protéase qui participe au contrôle de l'inflammation au niveau de l'utérus, il induit la prolifération des cellules immunitaires, mais est aussi capable de limiter l'activation des neutrophiles en inhibant la voie NF- κ B⁶⁰. La lactoferrine, principalement stockée au niveau des granules des neutrophiles, est une glycoprotéine pouvant chélater le fer, élément essentiel à la croissance de différentes bactéries, et qui, en entrant en compétition avec elles, limite leur croissance⁶¹. L'alarmine (S100) ou la calprotectine, produite par les neutrophiles peuvent agir de manière similaire, en chélatant le zinc¹⁵. Les lectines liant le mannose (MBL) sont d'autres molécules antimicrobiennes capables de reconnaître les motifs glucidiques à la surface de micro-organismes pathogènes, et d'entraîner leur opsonisation⁶². Tous ces peptides antimicrobiens peuvent être produits de manière constitutive mais aussi induits par l'inflammation ou des pathogènes.

1.2.2.3 Cellules immunitaires innées

Les muqueuses du TRF sont riches en cellules immunitaires (6 à 20% des cellules des muqueuses du TRF), et leur fréquence augmente depuis le tractus bas jusqu'au tractus haut⁶³. La composition et le phénotype des principales cellules immunitaires innées est listée dans le Tableau 1 pour les différents compartiments du TRF. Les cellules dendritiques et les macrophages sont les principales cellules présentatrices d'antigènes au niveau du TRF. Les cellules NK sont également présentes dans l'ensemble du TRF et représentent environ 20% des leucocytes^{4,63}. Leur phénotype a été caractérisé en conditions physiologiques ou

pathologiques, et quelques études ont été réalisées sur leurs fonctions dans le tissu⁶⁴. Ces cellules sont impliquées dans la défense contre les pathogènes. D'autres cellules immunitaires présentes au niveau du TRF ont des propriétés du système immunitaire inné : des lymphocytes T non conventionnels tels que les cellules T invariant associées aux muqueuses (MAIT), ou encore les lymphocytes T $\gamma\delta$, exprimant un TCR invariant^{65,66}. Les granulocytes sont aussi présents dans tout le TRF. Les granulocytes neutrophiles, qui représentent 10 à 30% des leucocytes sont les granulocytes majoritaires. Les caractéristiques de ces derniers seront détaillées dans la partie 1.2.2.4).

Cellules présentatrices d'antigènes (DC et macrophages)

Les cellules présentatrices d'antigènes (APC) représentent environ 10% des leucocytes dans tous les tissus du TRF, mais leur fréquence est plus importante dans l'endomètre que dans les autres tissus du TRF. Au niveau du vagin, il a été montré que les DC polarisent plutôt la réponse lymphocytaire de type Th2, et des phénotypes de cellules régulatrices tandis que les macrophages polarisent la réponse lymphocytaire Th1, pro-inflammatoire^{67,68}. Les macrophages sont situés dans la zone subépithéliale de la muqueuse. Le phénotype des APC varie en fonction des compartiments du TRF. Dans l'endomètre, les macrophages ont un phénotype proche des macrophages de type M2b, avec une forte expression de CD163, CD86 et HLA-DR, ainsi qu'une plus faible expression de CD80 et CD16⁶⁹. Ces cellules secrètent du TNF α , de l'IL-1RA et de l'IL-6⁶⁷. Au niveau vaginal, les macrophages expriment CD13, HLA-DR, CD163, CD86, CD16, CD32, CD64 et CD89⁶⁹. Elles expriment également le récepteur et les corécepteurs du VIH-1 : CD4, CCR5 et CXCR4⁷⁰. Les cellules dendritiques sont retrouvées dans le stroma au niveau du tractus haut, alors qu'elles sont majoritairement retrouvées dans l'épithélium au niveau du tractus bas⁷¹. Il existe deux types de DC au sein des muqueuses génitales : les cellules de Langerhans (LC) résident au sein de l'épithélium pluristratifié dans le compartiment inférieur du TRF. Les DC stromales quant à elles, sont retrouvées sous l'épithélium⁷¹. Les LC possèdent de longues dendrites formant des extensions entre les cellules épithéliales jusqu'à la lumière vaginale. Ce sont les premières cellules immunitaires à entrer en contact avec des pathogènes⁷². Les LC expriment CD1a, CD207 et CD11c⁷¹. Il existe différentes populations de DC stromales vaginales : exprimant DC-SIGN ou HLA-DR, CD11c, CD86 et plus faiblement CD1c.

Tableau 1 : Composition et phénotype des cellules immunitaires des muqueuses du TRF. Le phénotype des principales cellules immunitaires présentes dans les différents compartiments du TRF est décrit ci-dessous. Créé à partir de Manaster et al, 2010, Mselle et al, 2007, Jensen et al, 2012, Duluc et al, 2013, Shen et al, 2009, Schulke et al, 2008, Rodriguez-Garcia et al, 2014 & 2017 & 2018, Trifonova et al, 2014, Monin et al, 2020, Shaw et al, 2011, Sathaliyawala et al, 2013, Weisel et al, 2022, Rosser et al, 2015 and Vine et al, 2022^{67,69,70,73-85}.

	Vagin	Col de l'utérus	Utérus	Trompes
NK cells (CD56⁺ CD3⁻ CD9⁺)	+	+	++	+
CD16	+	+/-	+/-	+/-
CD69	-	+/-	+	+
CD94	-	+/-	+	+
Macrophages (CD3⁻ CD68⁺ CD16⁺)	+	+	++	+
CD14	+ ou -	+ ou -	+ ou -	+ ou -
CD163	+	+	+/-	+/-
CD80	ND	ND	+/-	+/-
CD86	+	+	+	+
HLA-DR	+/-	+/-	+	+
CD4, CCR5 et CXCR4	+/-	ND	ND	ND
CD16, CD32, CD64	+	ND	ND	ND
Cellule dendritique (CD3⁻ HLA-DR⁺)	+/-	+/-	+/-	+/-
Cellules de Langerhans (CD207 ⁺ CD1a ⁺)	Présents dans les différents compartiments du TRF			
DC stromales				
CD1c	+	+	+	ND
CD14	+ ou -	+ ou -	+ ou -	ND
CD80/CD86	+/-	ND	+/-	ND
CD103	-	-	+/-	ND
DC-SIGN	+	+/-	-	ND
pDC (CD123 ⁺)	Présents dans les différents compartiments du TRF			
mDC (CD11c ⁺)				
Lymphocyte T (CD3⁺ CD56⁻)	+++	+++	++	+++
Ratio (T CD8 ⁺ : T CD4 ⁺)	3:2	1:1	3:2	3:2
T _{naïf} (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD62L ⁺)	Faible proportion			
T _{effecteur mémoire} (CD45RO ⁺ CD27 ⁻ CCR7 ⁻)				
T _{EMRA} (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD27 ⁻)				
T _{central mémoire} (CD45RO ⁺ CCR7 ⁺)				
T _{reg} (CD25 ⁺ CD127 ⁻ FOXP3 ⁺)				
T _{actif} (CD69 ⁺ , CD62L ⁺ , CD25 ⁺ /HLA-DR ⁺)	Présents dans les différents compartiments du TRF			
T _{résidente mémoire} (CD69 ⁺ , CD103 ⁺)				
Th17 (RORC ⁺ , IL17 ⁺)				
Lymphocyte B (CD3⁻ CD19⁺ CD20⁺)	+/-	+/-	+/-	+/-
B _{naïves} (CD27 ⁻)	Présents dans les différents compartiments du TRF, mais phénotype			
B _{mémoires} (CD27 ⁺)	mémoire non décrit			
B _{reg} (CD24 ^{high})	-	-	-	-
Autres cellules immunitaires				
Plasmocyte (CD19 ⁻ CD20 ⁻ CD27 ⁺ CD138 ⁺ ou CD38 ⁺)	+	+	+	+
NKT (CD3 ⁺ CD56 ⁺)	+	+	+	ND
Cellules MAIT	+	+	+	ND
T _{γδ}	+	-	-	ND
ILC (1 et 3)	-	ND	-	ND

Cette dernière population (HLA-DR⁺ CD1c⁺ CD86⁺) peut exprimer ou non CD14⁶⁷. Dans l'endomètre, il existe également différentes populations de DC, exprimant CD83, CD1a ou CD123⁷⁵.

Les cellules NK

La fréquence et le phénotype des cellules NK varie dans les différents compartiments du TRF et ont des caractéristiques différentes des cellules NK présentes dans le sang^{74,86}. Au niveau de l'endomètre, où leur fréquence est la plus importante, elles expriment fortement CD56 et n'expriment pas ou peu CD16. Les cellules NK utérines expriment différents TLR et répondent à des stimulations cytokiniques ou par des PAMP⁸⁷. Les cellules NK possèdent une activité cytotoxique faible et sont capables de produire des cytokines immunomodulatrices. Leur activité est régulée par le TGFβ⁷³.

Le phénotype et les fonctions des cellules NK est mieux connu à l'interface materno-fœtale, au niveau de la décidua, qui correspond à la muqueuse utérine au cours de la grossesse. Ces cellules sont phénotypiquement différentes des cellules NK de l'endomètre utérin chez une femme qui n'est pas enceinte. Les cellules NK de la décidua sont impliqués dans de nombreuses fonctions : protection contre les pathogènes, maintien de la tolérance, ...

1.2.2.4 Les neutrophiles

Les neutrophiles jouent un rôle essentiel au niveau de l'immunité innée de par leurs propriétés antimicrobiennes. Leur rôle a été principalement étudié au niveau sanguin, où ils représentent la majorité (50 à 70%) des leucocytes circulants. Ils ont une demi-vie très courte (environ 19h), et leurs propriétés évoluent au cours du temps, en suivant un rythme circadien⁸⁸. De nombreuses sous-populations de neutrophiles peuvent être distinguées en fonction de leur état de maturation, ou d'activation⁸⁹.

Origine hématopoïétique

Les neutrophiles sont générés dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur granulocyte-monocyte (GMP), engagé dans la lignée myéloïde. La granulopoïèse est sous le contrôle de nombreuses cytokines et facteurs de croissances, en particulier le G-CSF, dont la cinétique suit un rythme circadien très proche de celui de la cinétique des neutrophiles⁹⁰. Il y a deux

phases principales dans le développement des neutrophiles : une phase proliférative et une phase non proliférative. Dans la phase proliférative, le GMP se différencie en myéloblaste, puis en promyélocyte (caractérisé par un noyau rond et un cytoplasme sombre) et enfin en myélocyte (caractérisé par un noyau rond et un cytoplasme moins sombre). L'initiation de la phase non proliférative commence par la différenciation des myélocytes en métamyélocytes (caractérisés par un noyau en forme de rein et un cytoplasme clair), puis en neutrophiles à bande et enfin, en neutrophiles matures (caractérisés par un noyau segmenté et un cytoplasme clair)^{88,91} (Figure 5). Au cours du processus de maturation des neutrophiles, différents granules sont formés dans le cytoplasme des neutrophiles, ainsi que des vésicules sécrétoires contenant différentes protéines plasmatiques. Il existe trois types de granules : les granules primaires (ou granules azurophiles), secondaires (granules négatifs à la peroxydase) et tertiaires (ou granules gélatinase)^{92,93}. Les granules primaires contiennent notamment la myéloperoxydase et des défensines, les granules secondaires contiennent notamment la lactoferrine et la gélatinase. Enfin, les granules tertiaires sont principalement composés de métalloprotéase de matrice 9. Dans le sang, il existe trois phénotypes de neutrophiles : les préneutrophiles (CD10⁻, CD101⁺), les neutrophiles immatures (CD10⁺, CD101^{mid}) et matures (CD10⁺, CD101⁺), majoritaires⁹⁴. Dans la circulation sanguine, les neutrophiles à bande (immatures) représentent de 0 à 10 % des neutrophiles totaux⁹⁵. Les pré-neutrophiles sont absents de la circulation sanguine en condition physiologique.

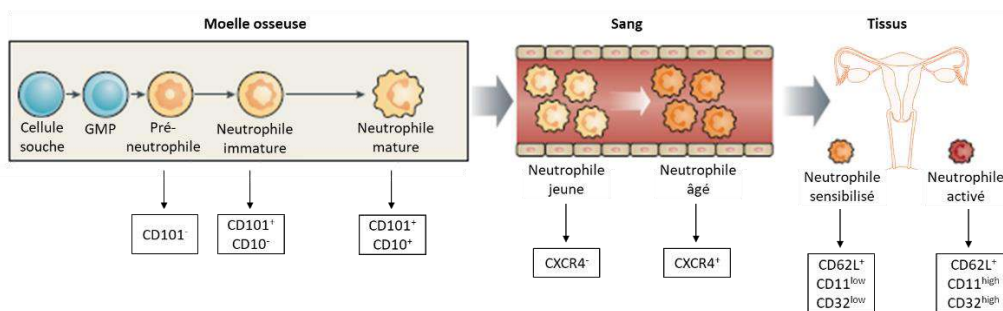


Figure 5 : Etapes de la circulation des neutrophiles et sous-populations de neutrophiles. Les neutrophiles mûrissent dans la moelle osseuse. Ils se distinguent lors des différentes étapes de leur différenciation par l'expression différentielle de leurs marqueurs de surface d'une part, et d'autre part par leur aspect morphologique, notamment au niveau du noyau. Dans le sang, les neutrophiles subissent un vieillissement circadien. Différents signaux peuvent entraîner leur recrutement au niveau des tissus. L'entrée des neutrophiles au niveau du TRF résulte en leur sensibilisation ou leur activation. Au niveau du TRF, les neutrophiles assurent différentes fonctions antimicrobiennes. Modifiée à partir de Ng et al, 2019⁸⁹.

Activation et propriétés antimicrobiennes

Trois catégories de neutrophiles sont identifiées en fonction de leur état d'activation : les neutrophiles non activés, sensibilisés, et activés (Figure 5). Les neutrophiles non activés ont une morphologie ronde, ils n'adhèrent pas à l'épithélium et répondent faiblement à un stimulus. Sous l'influence d'un stimulus, les neutrophiles deviennent sensibilisés et peuvent présenter une réorganisation de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, enzyme impliquée dans leur fonction cytotoxique. L'activation des neutrophiles favorise entre autres l'assemblage complet de la NADPH oxydase au niveau de la membrane plasmique et une augmentation de l'expression de marqueurs de surfaces CD11b, CD32a⁹⁶. Un stimulus pro-inflammatoire (LPS, TNF α , IL-18, IL-8, GM-CSF, ...) ou un gradient de chimiokines peut mener à la migration par diapédèse de neutrophiles sensibilisés dans un tissu^{97,98}. Au niveau de l'utérus, le gradient d'IL-8 pourrait être à l'origine du recrutement des neutrophiles au sein du TRF, via la voie de signalisation du récepteur CXCR2^{52,99}. Au sein du tissu, la reconnaissance de PAMP ou la liaison d'un de leurs récepteurs de surface (récepteur Fc γ , lectine de types C, ou récepteur au complément) à leur ligand entraîne l'activation des neutrophiles¹⁰⁰. Les neutrophiles assurent alors une fonction antimicrobienne par de nombreux mécanismes (Figure 6). L'exocytose des granules contenues dans leur cytoplasme libère d'une part de nombreuses cytokines qui favoriseront l'organisation de la réponse immunitaire¹⁰¹, et d'autre part, des protéines aux fonctions antimicrobiennes. L'élimination des pathogènes est médiée, entre autres, par la libération d'alarmines¹⁰² et par l'induction de la NADPH oxydase, qui permet la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)⁹⁶. Cette production est régulée par des cytokines, qui peuvent moduler la sensibilisation de la NADPH oxydase et donc la libération de ROS¹⁰³. Les neutrophiles peuvent aussi phagocyter des pathogènes via la liaison de leurs récepteurs de surface. Ces récepteurs peuvent lier directement le micro-organisme à phagocyter (lectines, intégrines, ...) ou de manière indirecte, par engagement du micro-organisme opsonisé avec des IgG, ou des fragments du complément par exemple. L'engagement du récepteur déclenche une voie de signalisation permettant l'internalisation du micro-organisme dans un phagosome¹⁰⁴, l'assemblage et l'activation du complexe NADPH oxydase et la mobilisation de granules.

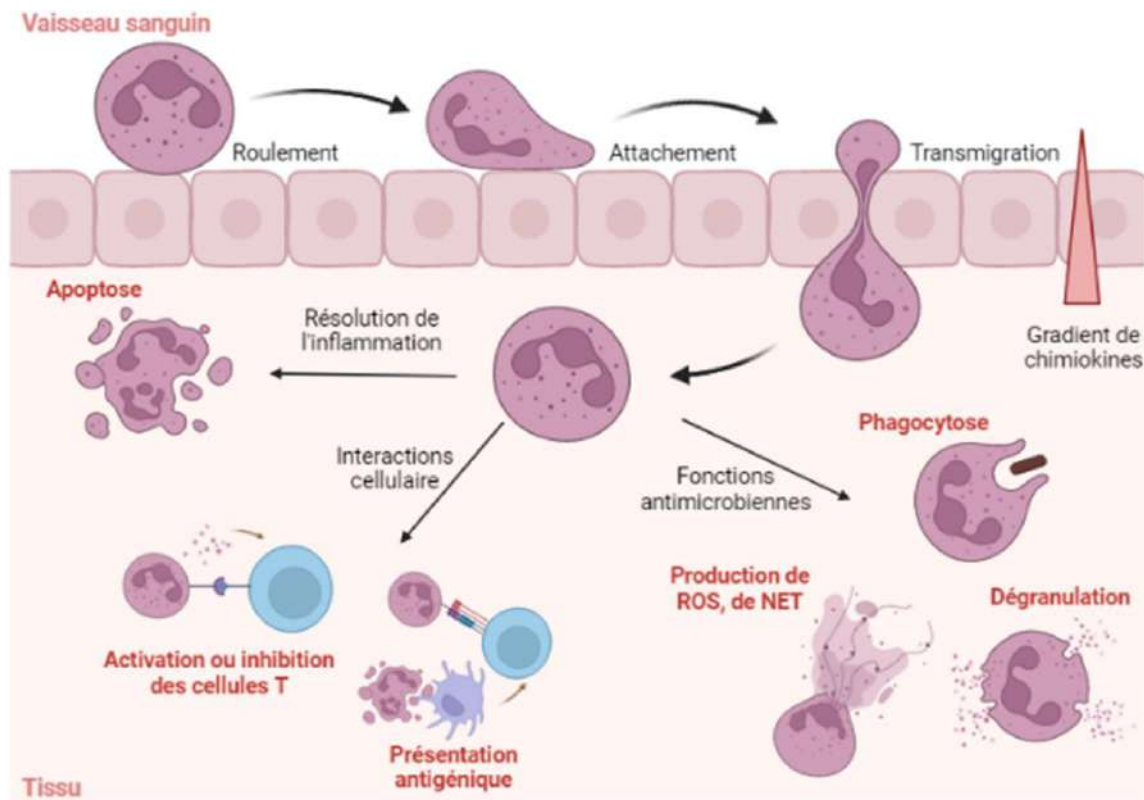


Figure 6 : Fonctions des neutrophiles. Sous l'influence d'un gradient de chimiokines, les neutrophiles peuvent être recrutés au sein d'un tissu et participent à la réponse inflammatoire. Les neutrophiles assurent des fonctions antimicrobiennes via la dégranulation de granules ou vésicules. Ce sont des phagocytes « professionnels » capables d'éliminer les pathogènes. Les neutrophiles activés produisent aussi différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des pièges extracellulaires (NET) aux propriétés antimicrobiennes. De par leurs interactions avec d'autres cellules immunitaires, les neutrophiles permettent également l'orchestration de la réponse immunitaire adaptative. Leur apoptose permet la résolution de l'inflammation. Créée sur Biorender.com.

La fusion du phagosome avec le granule et la production de ROS créent un environnement létal, capable de tuer la majorité des microbes ingérés en 30 minutes¹⁰⁵. Les neutrophiles sont également capables de produire des pièges extracellulaire (*neutrophil extracellular trap*, NET), qui sont des fibres composées d'ADN auxquelles sont fixées différentes protéines telles que des histones, protéines aux fonctions antimicrobiennes (lactoferrine, cathepsine), des protéases (élastase, gélatinase) ou encore des enzymes permettant la production de ROS (myéloperoxydase, MPO)^{106,107}. Les NET permettent l'immobilisation des pathogènes et facilitent ainsi leur phagocytose¹⁰⁸. Enfin, les neutrophiles participent activement au remodelage tissulaire dans le processus de cicatrisation, à la suite d'une infection ou d'une inflammation au niveau tissulaire¹⁰⁹.

Interactions

Les neutrophiles peuvent interagir directement ou indirectement (via la production de cytokines) avec des macrophages, des DC ou encore des lymphocytes B ou T, et participent ainsi à l'élaboration des réponses immunitaires adaptatives (Figure 6)¹¹⁰. Les neutrophiles immatures augmentent la survie, la prolifération et la production d'IFN γ par les lymphocytes T¹¹¹. A l'inverse, les neutrophiles matures participent à la suppression des lymphocytes T médiée par l'expression de PD-L1^{111,112}. Par ailleurs, les lymphocytes T producteurs d'IL-17A régulent la production de G-CSF, et donc la prolifération et la maturation des neutrophiles¹¹³. Les neutrophiles peuvent aussi promouvoir la survie, la maturation et la différenciation des lymphocyte B par divers mécanismes^{114,115}. De manière générale, les neutrophiles ont un rôle ambivalent : ils sont primordiaux pour répondre aux infections ou aux dommages tissulaires, mais des sous-populations peuvent également participer à l'aggravation de certaines pathologies (maladies auto-immunes ou cancers)^{116,117}.

Étude au niveau des muqueuses du TRF

Les neutrophiles sont présents dans tous les compartiments du TRF, et leur nombre est croissant du tractus bas vers le tractus haut⁸. Le phénotype des neutrophiles au niveau du TRF diffère de celui des neutrophiles sanguins. Au niveau des trompes de Fallope, ils expriment peu CD66b, CD62L (nécessaires lors de la diapédèse), CXCR1 et CXCR2 (récepteurs à l'IL-8). À l'inverse, d'autres récepteurs sont surexprimés à la surface des neutrophiles dans les trompes : HLA-DR et CD64 (marqueurs de priming et d'activation, respectivement), et ils expriment plus certaines cytokines (IFN γ , VEGF) que les neutrophiles du sang périphérique¹¹⁸. A ce jour, les neutrophiles sont peu étudiés au niveau des muqueuses du TRF : leur phénotype et fonctions sont peu décrits.

1.2.3 Immunité spécifique

Les lymphocytes sont les principales cellules immunitaires retrouvées au niveau du TRF. Les lymphocytes présents au niveau du TRF sont des cellules résidentes du tissu ou bien peuvent provenir de la circulation systémique, mais ils assurent des fonctions différentes des lymphocytes sanguins^{63,79}. La composition et le phénotype des principales cellules immunitaires adaptatives est listée dans le Tableau 1 pour les différents compartiments du TRF.

1.2.3.1 Lymphocytes T

Ils représentent 40 à 50% des cellules immunitaires des muqueuses du TRF et, à l'inverse des autres cellules immunitaires, leur proportion augmente du tractus haut au tractus bas^{25,78}, sauf au niveau de la zone de transformation, où la fréquence de lymphocytes T est maximale¹¹⁹. Il y a moins de lymphocytes T CD4⁺ que de CD8⁺ (environ 60%) dans les différents compartiments du TRF, sauf au niveau de l'utérus, où le ratio CD4/CD8 est proche de 1²⁵. Au niveau du TRF, les lymphocytes T ont principalement un phénotype mémoire, mais il existe aussi une faible proportion de cellules naïves CD45RA⁺¹¹⁹. Au niveau du col, les lymphocytes T ont majoritairement un phénotype de type Th17 : ils expriment le récepteur nucléaire orphelin ROR γ t (RORC2) et produisent de l'IL-17 et CCL20⁷⁶. La fréquence des lymphocytes T de type Th17 est moins élevée dans l'utérus. Ces lymphocytes pourraient provenir d'un recrutement de lymphocytes présents dans le sang et/ou d'une prolifération *in situ* des lymphocytes résidents du TRF⁶³. Une revue récente décrit les caractéristiques et les fonctions des cellules immunitaires résidant dans les tissus du TRF¹²⁰.

Au niveau de différentes muqueuses, l'IL-7 est impliqué dans le recrutement de lymphocytes T au niveau du tissu¹²¹. Les lymphocytes sont localisés dans la *lamina propria*, et au niveau du tractus génital haut, ils peuvent s'organiser en structures appelées agrégats lymphoïdes, avec un noyau central composé de lymphocytes B, entouré de lymphocytes T (majoritairement CD8⁺) et de macrophages¹²².

1.2.3.2 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont présents en faible quantité dans tout le TRF et représentent 1 à 10% des leucocytes. Il n'y a pas de variation significative de la fréquence de lymphocytes B entre les différents compartiments du TRF¹²³. Dans le tractus génital haut, ils sont exclusivement présents au sein des agrégats lymphoïdes, alors qu'ils sont plus dispersés au sein de la *lamina propria* dans le tractus génital bas¹²⁴. Des plasmocytes CD38⁺ producteurs d'Ig peuvent aussi être retrouvés de manière diffuse dans la muqueuse¹²⁴. Dans l'utérus, les lymphocytes B expriment CD45RA¹²⁵. Au niveau vaginal, les cellules B mémoire circulantes dans le sang peuvent être recrutées dans la muqueuse vaginale (via CXCR3) et sécréter des IgG et IgA dans la lumière¹²⁶. Ces anticorps jouent un rôle important dans la protection

contre les IST au niveau du TRF. Contrairement à la majorité des sécrétions externes, les sécrétions cervicovaginales contiennent plus d'IgG que d'IgA, et la quantité d'IgA1 est proche de celle d'IgA2¹²⁷.

1.3 Régulations du système immunitaire par le cycle menstruel

1.3.1 Régulations cellulaires

Le cycle menstruel a un impact sur les cellules épithéliales et immunitaires au niveau du TRF⁹. Au niveau de l'utérus, des modifications de l'endomètre ont lieu tout au long du cycle utérin¹²⁸. *In vitro*, dans un modèle de souris, l'œstradiol diminue par exemple la résistance transépithéliale de cellules utérines polarisées, et aurait donc un effet sur l'intégrité de la barrière épithéliale¹²⁹. Il contrôle également l'expression du pIgR à la surface des cellules épithéliales¹³⁰. L'œstradiol aurait aussi un effet activateur sur la capacité de présentation antigénique des cellules épithéliales utérines ou vaginales^{18,19}.

Dans l'endomètre, le nombre de cellules immunitaires varie au cours du cycle, contrairement aux autres tissus du TRF, où le nombre de cellules est peu ou pas affecté par les variations hormonales (Figure 7)¹³¹. Lors de l'ovulation et pendant les menstruations, la fréquence de cellules NK, de macrophages et de neutrophiles est élevée dans l'utérus. À l'inverse dans le vagin, le nombre de cellules NK, de macrophages et de neutrophiles reste constant au cours du cycle menstruel¹³². Dans le tractus haut, la taille des agrégats lymphoïdes présents dans la *lamina propria* augmente également après l'ovulation¹²² et peut comporter jusqu'à 10 fois plus de cellules que lors de la phase proliférative¹³³. Au niveau de l'utérus, les neutrophiles jouent un rôle spécifique lors des menstruations : ils libèrent de l'élastase, qui active des métalloprotéases extracellulaires (MMP), favorisant la desquamation de l'endomètre et augmente les défenses immunitaires^{4,134}. Dans un modèle de souris neutropéniques, les concentrations plasmatiques des hormones sexuelles sont perturbées et le cycle œstral est bloqué de manière réversible. Ces données suggèrent un rôle des neutrophiles dans la régulation des hormones sexuelles¹³⁵. À l'inverse, d'autres données montrent un rôle des hormones sexuelles dans la régulation de la migration des neutrophiles au niveau du TRF : au cours de l'ovulation, les neutrophiles sont peu fréquents dans la lumière vaginale¹³⁶.

Col de l'utérus

Utérus

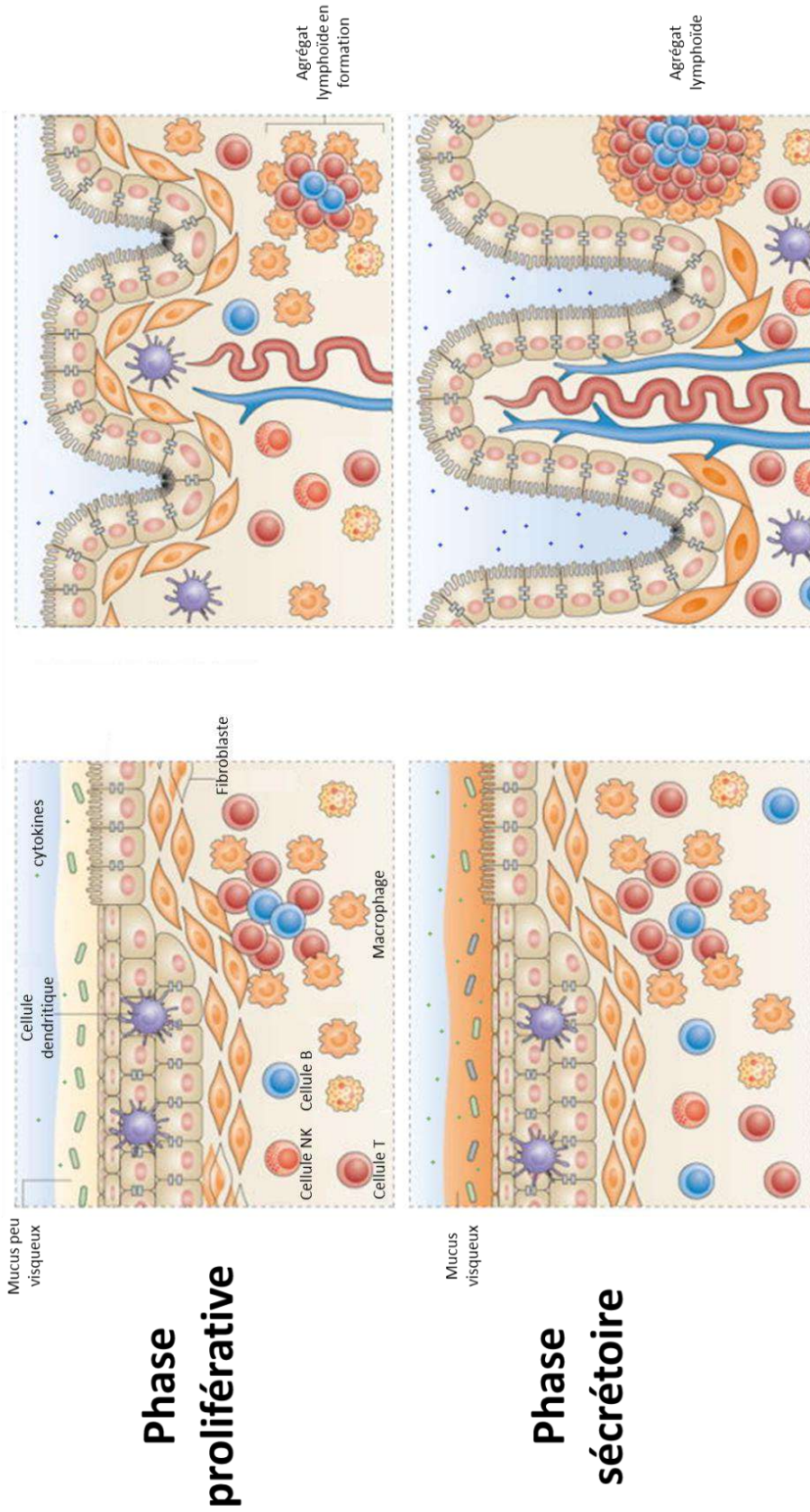


Figure 7 : Modifications au niveau des muqueuses du TRF au cours du cycle menstruel. L'épaisseur de l'épithélium stratifié reste relativement constante au cours du cycle. En revanche, dans l'utérus, les cellules de l'épithélium simple prolifèrent lors de la phase sécrétoire. La muqueuse est fortement vascularisée, riche en glandes sécrétoires et présente des agrégats lymphoïdes plus gros. Dans la lumière du tractus, différents facteurs solubles varient au cours du cycle menstruel. Au niveau cervico-vaginal, la viscosité du mucus augmente lors de la phase sécrétoire. Modifiée à partir de Wira et al, 2015⁹.

Par ailleurs, dans un modèle de souris infecté par *C. albicans*, un traitement à l'œstradiol diminue la migration des neutrophiles vers le vagin en limitant l'expression des récepteurs de "homing" CD44 et CD47 à la surface des cellules épithéliales vaginales¹³⁶. La progestérone a un effet inverse. Une autre étude confirme le rôle de ces hormones, avec des profils de migration similaires suite à l'ajout de progestérone ou d'œstradiol⁵². Dans cette étude, les auteurs mettent en lumière le rôle de l'axe CXCL1/CXCR2 dans le contrôle de la rétention des neutrophiles au niveau du stroma vaginal : lors de la phase lutéale, la concentration forte de progestérone favorise une forte concentration de CXCL1, qui favorise la migration des neutrophiles. L'expression de différents marqueurs de surface varie également au cours du cycle menstruel, avec par exemple une augmentation de l'expression de CD4 après l'ovulation au niveau des cellules épithéliales utérines et ectocervicales¹³⁷. L'expression des TLR varie également au cours du cycle menstruel. Les ARNm de nombreux TLR sont plus exprimés lors de la phase sécrétoire dans l'endomètre^{138,139}.

1.3.2 Régulation des facteurs solubles

La viscosité du mucus varie grandement au cours du cycle menstruel. Au niveau du col, il a une viscosité 2000 fois supérieure à celle de l'eau au cours de la majorité du cycle menstruel, mais sa viscosité peut diminuer jusqu'à 95% au moment de l'ovulation (Figure 7)¹⁴⁰. La concentration de différents peptides antimicrobiens (SLPI, HBD-2, peptides neutrophiles humains (HNP)-1/2/3, lactoferrine) varie au long du cycle menstruel, avec une forte concentration lors de la phase proliférative et une plus faible concentration à partir de l'ovulation et jusqu'à la fin de la phase sécrétoire⁶¹. La plupart des cytokines et chimiokines retrouvées au niveau cervicovaginal sont régulées par les hormones sexuelles, mais certaines ne varient pas en fonction du cycle menstruel¹⁴¹. Par exemple, la concentration d'IL-6 et d'IL-8 augmente dans les fluides cervico-vaginaux pendant la phase folliculaire. À l'inverse, la concentration d'IL-18, CCL2, IL-10, IL-17 et de TGF β est plus forte lors de la phase sécrétoire^{137,142,143}. La production d'anticorps varie également au cours du cycle menstruel, avec un pic de production d'IgA, IgM et IgG autour de l'ovulation^{144,145}.

L'ensemble des facteurs de l'environnement présents au niveau du TRF (pH vaginal, mucus, barrière épithéliale, facteurs solubles, cellules immunitaires, hormones sexuelles, ...) ont un

impact sur l'inflammation au niveau du TRF. D'autres facteurs de l'environnement sont présents au niveau du TRF et ne sont pas produits par l'organisme (ex : le microbiote vaginal ou le liquide séminal). Ces facteurs peuvent également moduler les niveaux d'inflammation locale.

2 LE MICROBIOTE VAGINAL

Toutes les muqueuses de l'organisme sont colonisées par un ensemble de microorganismes formant le microbiote. La plupart de ces microorganismes sont commensaux et, en interagissant avec l'hôte, participent à différents processus physiologiques tel que la régulation de la réponse immunitaire ou encore des processus métaboliques¹⁴⁶. Les muqueuses du TRF sont principalement colonisées par le microbiote vaginal et dans une moindre mesure par un microbiote utérin, dont l'existence et le rôle sont encore controversés¹⁴⁷. Les trompes de Fallope sont aujourd'hui communément considérées comme stériles en conditions physiologiques. Le microbiote vaginal joue un rôle important sur les réponses immunitaires locales, l'inflammation et sur la susceptibilité à différentes IST¹⁴⁸.

2.1 Composition du microbiote vaginal

Le microbiote vaginal est composé de nombreuses bactéries, archées, champignons, protistes et virus¹⁴⁹. Chez la femme, cinq types de microbiotes vaginaux, basés sur la composition en bactéries, ont été décrits (Figure 8)¹⁵⁰. Les groupes I, II, III et V sont dominés par une espèce du genre *Lactobacillus* : *L. crispatus* (groupe I), *L. gasseri* (groupe II), *L. iners* (groupe III) ou *L. jensenii* (groupe V). Au contraire, les femmes possédant un microbiote vaginal du groupe IV sont colonisées par une plus grande diversité de bactéries (dysbiose) n'appartenant pas au genre *Lactobacillus* (ex : *Prevotella*, *Dialister*, *Atopium*, *Gardnerella*, *Megaphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Mobiluncus*). Ces bactéries ont majoritairement un type respiratoire anaérobique strict ou anaérobique facultatif. Le groupe IV peut être divisé en deux sous-groupes en fonction de la présence (groupe IVa) ou non (groupe IVb) d'une faible proportion du genre *Lactobacillus* au sein du microbiote vaginal¹⁵¹. L'augmentation

de la diversité microbienne et la forte abondance de bactéries anaérobies au niveau vaginal peut mener à une condition clinique appelée vaginose bactérienne (BV)¹⁵².

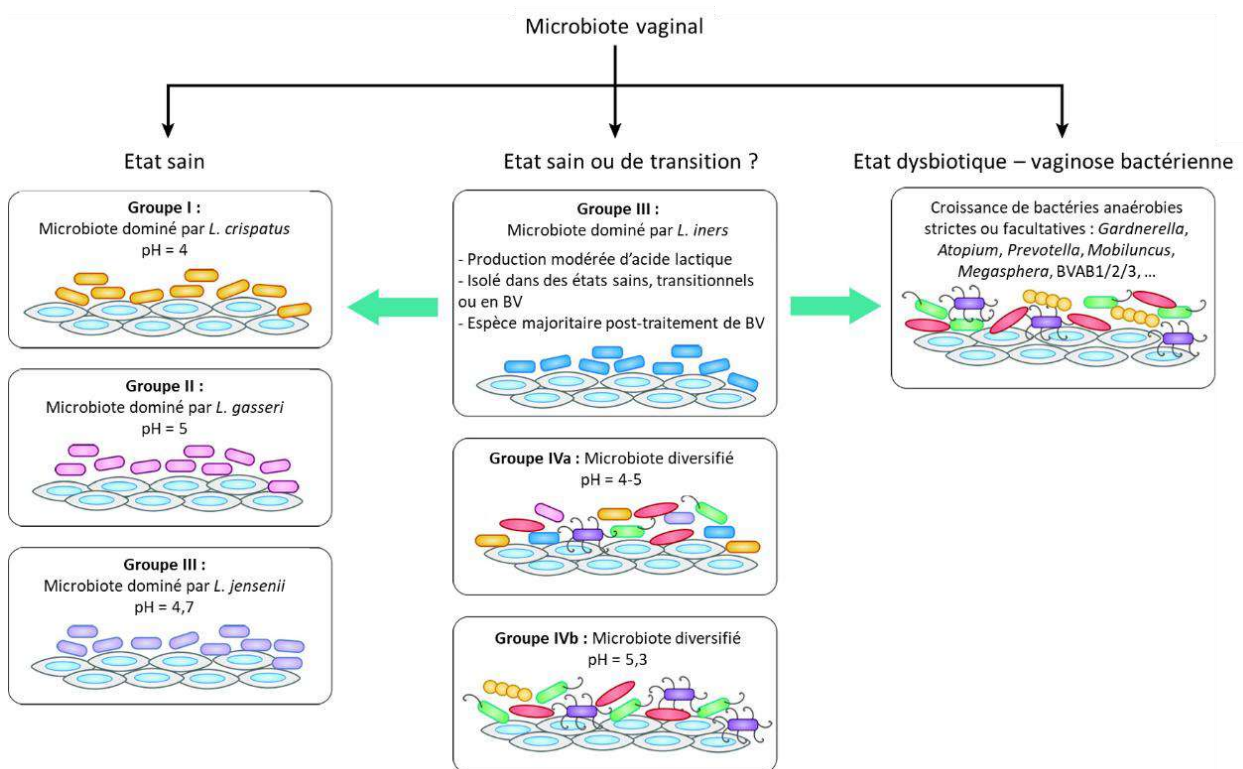


Figure 8 : Composition du microbiote vaginal. Le microbiote vaginal peut être divisé en cinq types de communautés. Les espèces dominantes les plus courantes sont *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. iners*. Les types de communautés de microbiote vaginal non dominés par des lactobacilles sont caractérisés par différentes espèces de bactéries anaérobies strictes (principalement du genre *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella* ou *Mobiluncus*). Ces différents microbiotes peuvent être associés à un état sain, dysbiotique, ou à un état de transition entre les deux. Modifiée à partir de Petrova et al, 2017¹⁵³.

La BV est souvent asymptomatique ou paucisymptomatique (odeur désagréable, pertes vaginales, démangeaisons), mais relativement fréquente et peut causer des complications notamment pendant la grossesse¹⁵⁴. Elle peut être diagnostiquée grâce au score de Nugent, une évaluation semi-quantitative se fondant sur l'examen de sécrétions vaginales après une coloration de Gram¹⁵⁵. Ainsi, la quantité de bactéries ayant un morphotype "lactobacille", "anaérobie et *Gardnerella*", ou "*Mobiluncus*" permet de classer les flores vaginales en 3 groupes : normal (0-3), intermédiaire (4-6), et BV (7-10).

2.1.1 Le genre *Lactobacillus*

Les *Lactobacillus* sont des bacilles Gram (+), de type anaérobique facultatif¹⁵⁶. Il existe différentes espèces de lactobacilles au niveau du microbiote vaginal. La présence de *L. crispatus* et *L. jensenii* au niveau vaginal a été corrélée avec la présence d'un environnement vaginal sain¹⁵⁷. La présence de *L. iners* au niveau vaginal est retrouvée chez des femmes saines et chez des femmes présentant des épisodes de BV¹⁵³. La présence de la bactérie corrèle avec celle de certains métabolites (tyramine, pipecolate, cadaverine, putrescine et agmatine) retrouvés chez des femmes présentant une BV¹⁵⁸. Chez les femmes présentant un microbiote vaginal optimal, une forte concentration en glycogène au niveau vaginal (produit par les cellules épithéliales), favorise la croissance des lactobacilles et est associé avec un environnement vaginal sain^{159,160}.

Différentes espèces de lactobacilles ont été utilisées en tant qu'agents probiotiques pour améliorer la santé vaginale¹⁶¹. Ils pourraient entrer en compétition avec différents pathobiontes et favoriser un environnement vaginal optimal¹⁶². En effet, les lactobacilles produisent différents facteurs antimicrobiens^{61,163}, dont de l'acide lactique, qui participe au maintien d'un pH acide ($4 < \text{pH} < 5$) au niveau vaginal (Figure 9)¹⁶⁴. Les femmes possédant un microbiote vaginal de type I (dominé par *L. crispatus*) présentent le plus faible pH vaginal (autour de 4). Le pH acide a une action bactériostatique et en combinaison avec d'autres composés bactéricides ou bactériostatiques (tel que H_2O_2) produit par les lactobacilles, il maintient une faible diversité microbienne dans l'ensemble du microbiote vaginal¹⁶⁵. Les lactobacilles peuvent également produire des biofilms qui limitent l'adhésion des pathobiontes aux mucines et aux cellules épithéliales¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Ils pourraient également favoriser le processus de cicatrisation de l'épithélium vaginal, qui peut être endommagé au cours de rapports sexuels ou suite à des IST¹⁶⁹. D'autres études ont montré que différentes souches de lactobacilles, appartenant parfois à la même espèce, présentaient des propriétés différentes en fonction du microbiote vaginal duquel elles étaient isolées. En effet, les espèces isolées de microbiotes vaginaux intermédiaire ou au stade BV, sont associées à une plus forte inflammation au niveau vaginal (augmentation de la concentration d'IL-6, IL-8, IL-1 α , CCL3, CCL4, IL-1RA), comparés aux femmes ayant un microbiote vaginal optimal¹⁷⁰. Par ailleurs, les lactobacilles isolés chez des femmes au microbiote vaginal optimal

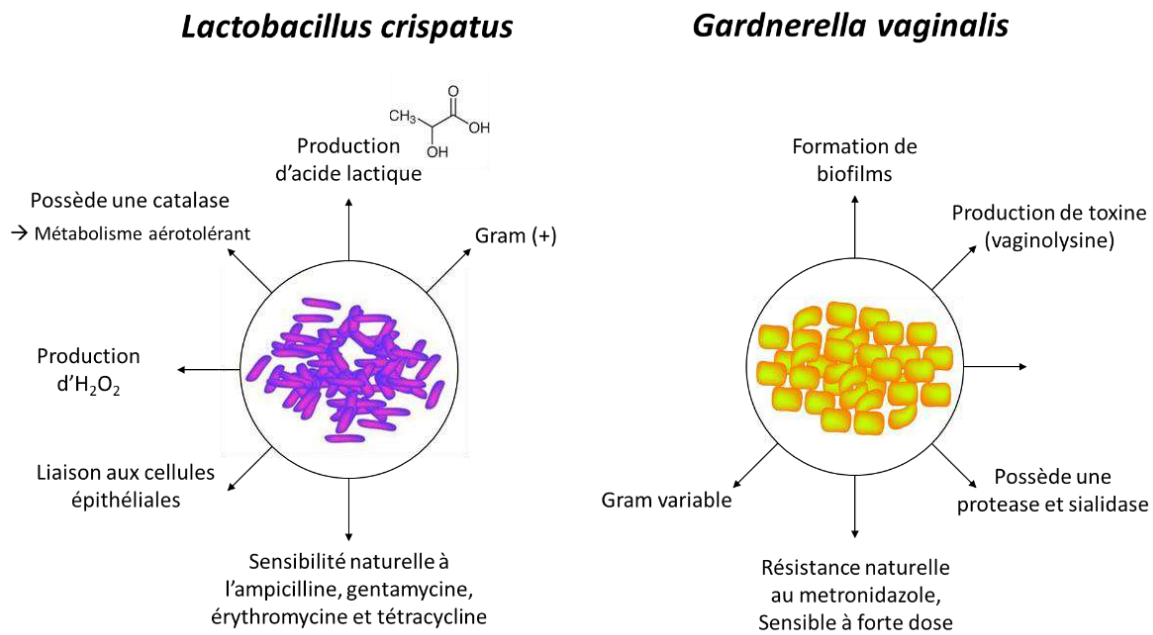


Figure 9 : Principales propriétés de bactéries du microbiote vaginal. Les propriétés structurales et métaboliques des espèces de *L. crispatus* et de *G. vaginalis*, principalement retrouvées dans les microbiotes de type I et IV (respectivement), sont représentées.

une forte production d'acide lactique et une forte capacité d'adhésion à différentes cellules présentes dans le TRF^{170,171}. Ces études mettent en évidence l'effet "souche" : les propriétés inflammatoires des lactobacilles dépendent fortement de la souche étudiée.

2.1.2 *Gardnerella vaginalis* et autres bactéries des microbiotes vaginaux de type IV

G. vaginalis est un coccobacille à Gram variable. Par rapport au genre *Lactobacillus*, le genre *Gardnerella* est hétérogène et diversifié. Comme d'autres bactéries anaérobies strictes, l'espèce *G. vaginalis* présente une forte diversité génétique et cela peut compliquer son assignation taxonomique¹⁷². *G. vaginalis* est principalement retrouvée dans les microbiotes vaginaux de type IV ou chez les femmes qui souffrent de BV¹⁷³. Les microbiotes vaginaux en dysbiose sont associés à un pH vaginal plus élevé ($5 < \text{pH} < 5.5$) et un environnement local plus inflammatoire, caractérisé par une concentration élevée de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la présence de cellules immunitaires activées¹⁷⁴. *G. vaginalis* est le principal agent producteur de biofilm au sein de ces microbiotes¹⁷⁵. La bactérie produit également des enzymes lytiques (vaginolyse, sialidase, prolidase...) indispensables pour permettre l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales de l'hôte (Figure 9)^{176,177}. Dans un modèle de coculture *in vitro*, *G. vaginalis* augmente la mortalité de lignées de cellules

épithéliales du TRF, et leur production de cytokines pro-inflammatoires¹⁷⁸. Les modèles actuels de mise en place de la BV comportent quatre étapes^{179,180} : (1) une colonisation par *G. vaginalis*, responsable d'une réduction du nombre de lactobacilles, (2) *G. vaginalis* produit un biofilm et facilite la croissance de bactéries anaérobies (*Prevotella bivia*, ...), (3) *G. vaginalis* produit des enzymes lytiques favorisant, en synergie avec certaines bactéries anaérobies (*P. bivia*), la destruction de la barrière de mucus à la surface des cellules épithéliales et (4) la colonisation par d'autres espèces anaérobies induit un environnement pro-inflammatoire.

2.2 Facteurs influençant le microbiote vaginal

De nombreux facteurs (génétiques ou environnementaux) influencent la composition du microbiote vaginal : l'origine ethnique, le cycle menstruel, les pratiques sexuelles, le mode de contraception, l'alimentation, le stress (Figure 10)^{181,182} ...

2.2.1 Facteurs génétiques

Une étude a montré que le microbiote vaginal des femmes pouvait varier en fonction de leur origine ethnique¹⁵⁰ : en effet, la proportion de femmes possédant un microbiote vaginal dominé par une espèce de lactobacille est supérieur chez les femmes blanches ou d'origine asiatique (90% et 80% respectivement) comparé aux femmes noires ou d'origine hispanique (62% et 60% respectivement). Le pH vaginal est également plus élevé chez les femmes noires ou d'origine hispanique.

2.2.2 Facteurs environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux ont un impact sur la composition du microbiote vaginal : les hormones et le cycle menstruel, le régime alimentaire, les comportement sexuels¹⁸³, ...

Impact du cycle menstruel

Au cours du cycle menstruel, la composition du microbiote vaginal varie sous l'influence des hormones¹⁸⁴. Lors de la phase proliférative, le taux d'œstrogène est élevé, et favorise la production de glycogène par les cellules épithéliales vaginales¹⁸⁵. Dans la lumière vaginale, le glycogène est dégradé en maltose, maltotriose et maltotétraoses par des amylases présentes au niveau des fluides vaginaux¹⁵⁹. Ces produits de digestion du glycogène

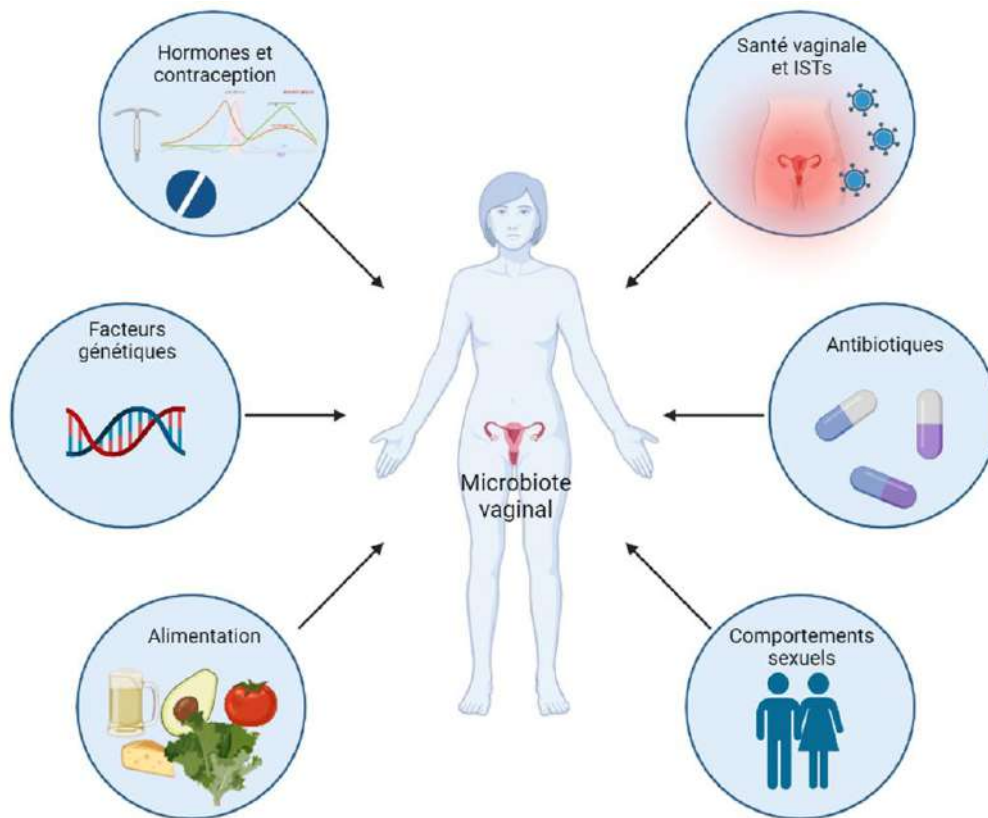


Figure 10 : Facteurs influençant la composition du microbiote vaginal. Les différents facteurs génétiques ou environnementaux (prise de médicaments, alimentations, pratiques sexuelles, ...) pouvant modifier la composition du microbiote vaginal sont représentés. Créée sur Biorender.com.

favorisent la croissance de différents lactobacilles. Après l'ovulation, lorsque le taux de progestérone augmente, la quantité de glycogène libre diminue et l'abondance relative des lactobacilles diminue¹⁸⁶. Au moment des menstruations, la quantité de bactéries anaérobies (*Gardnerella*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Anaerococcus*) augmente. *G. vaginalis* est souvent la bactérie majoritaire pendant les menstruations¹⁸⁷. Ces données sont confirmées par des études interventionnelles, où des femmes reçoivent de l'œstrogène ou de la progestérone dans le cadre de processus de fécondation *in vitro*¹⁸⁸. Les hormones sexuelles ont donc un impact sur la composition du microbiote vaginal.

Impact des comportements sexuels

Les comportements sexuels influencent également la composition du microbiote vaginal : par exemple, les douches vaginales favorisent la colonisation du microbiote vaginal par des bactéries anaérobies strictes et est associée à la BV¹⁸⁹. Par ailleurs, les rapports sexuels peuvent modifier la composition du microbiote vaginal¹⁹⁰. En effet, lors de rapports sexuels

non protégés, le sperme, qui possède également un microbiote, peut modifier la composition du microbiote vaginal. D'une part par l'apport de bactéries, et d'autre part via le liquide séminal, dont les propriétés biochimiques peuvent impacter le microbiote vaginal^{191,192}. Par ailleurs, une étude a montré que des bactéries du microbiote du pénis pouvait être retrouvées au niveau vaginal chez la femme et que la BV était donc transmissible par contact sexuel¹⁹⁰. De plus, une autre étude montre que les femmes qui présentent des épisodes de BV sont sujettes à des variations importantes de la composition de leur microbiote vaginal, favorisant l'apparition future de bactéries associées à la BV¹⁹³.

La contraception peut aussi avoir un impact sur la composition du microbiote vaginal : une étude a comparé différents dispositifs de contraception et a mis en évidence que certains dispositifs (dispositif hormonal intra-utérin ou au cuivre) pouvaient favoriser la colonisation par des bactéries associées à la BV ou à la présence d'IST, contrairement à d'autres (contraceptifs oraux combinés)^{194,195}. D'autres études montrent que l'utilisation de Depot-medroxyprogesterone acetate (DMPA) est associé à des variations de la composition du microbiote vaginal et des niveaux de médiateurs de l'inflammation au niveau du TRF^{196,197}.

2.3 Impact du microbiote sur le système immunitaire et inversement

Impact du microbiote sur le système immunitaire

De nombreuses études épidémiologiques montrent que le microbiote vaginal est le principal modulateur de l'inflammation au niveau génital^{198,199}. Les femmes possédant un microbiote vaginal dysbiotique possèdent une plus forte concentration de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF α , IFN γ , IL-8, IL-12, IL-4, IL-10), des altérations de la barrière épithéliale. La présence de différentes bactéries anaérobies (*Sneathia*, *Mobiluncus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, ...) est associée à cette inflammation (Figure 11)^{151,200-202}.

L'effet protecteur des lactobacilles sur l'inflammation serait en partie dû à leur capacité à produire de l'acide lactique²⁰³. Des expériences *in vitro* confirment les observations *in vivo* : dans différents modèles cellulaires dérivant de cellules épithéliales du TRF, l'exposition à des bactéries anaérobies, mais pas à des lactobacilles, entraîne une augmentation de la production de différentes cytokines pro-inflammatoires en fonction des modèles, et pourraient aussi altérer l'intégrité de la barrière épithéliale^{204,205}. Par ailleurs, à partir de

cytobrosses vaginales collectées chez des femmes ayant ou non une BV, Anahtar et al. ont pu montrer que le profil transcriptomique des APC variait en fonction de la composition du microbiote vaginal, avec une surexpression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire chez les femmes atteintes de BV²⁰⁶.

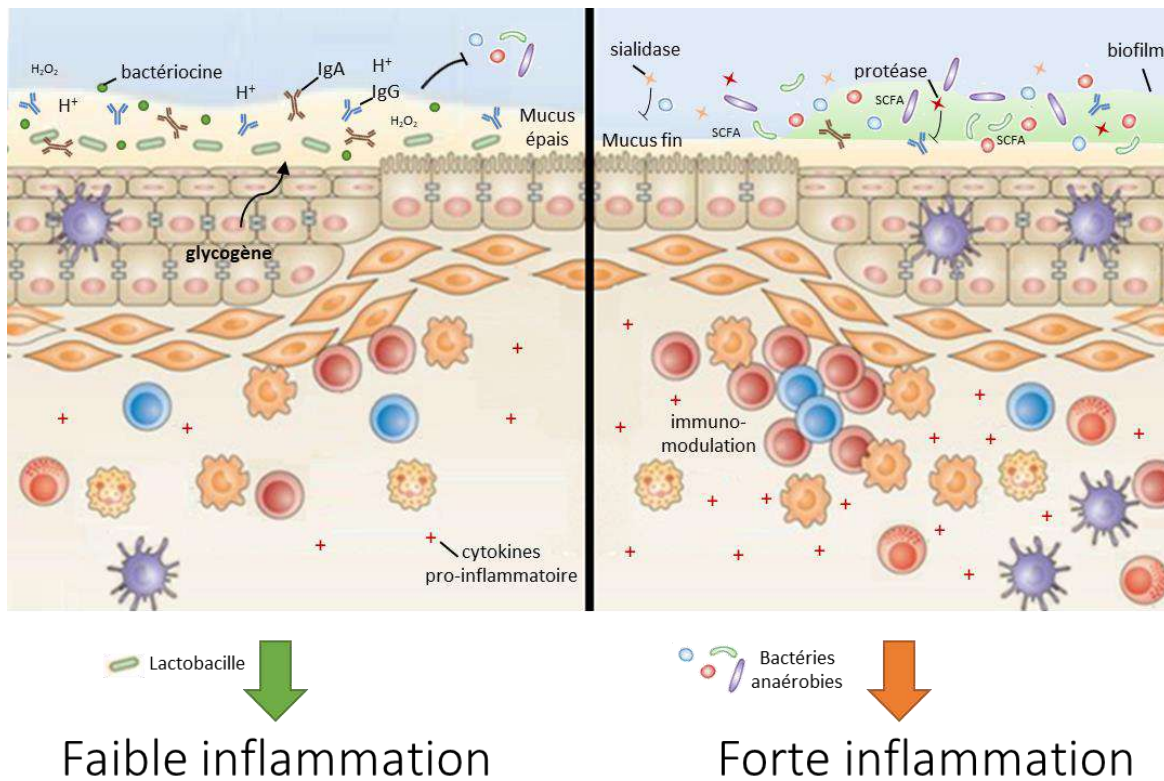


Figure 11 : Impact du microbiote vaginal au niveau des muqueuses du TRF. La composition du microbiote vaginal influence l'inflammation au niveau des muqueuses du TRF. (Gauche) Les microbiotes vaginaux dominés par une espèce de lactobacille (CST I, II, III et V) présentent un mucus épais, un pH vaginal bas et une faible quantité de cytokines pro-inflammatoires. La synthèse de glycogène au niveau de l'épithélium favorise la croissance des lactobacilles. Les lactobacilles produisent différents composés (acide lactique, bactériocines, ROS dont H₂O₂, ...) limitant la prolifération d'autres espèces bactériennes. (Droite) A l'inverse, les microbiotes vaginaux présentant une forte diversité microbienne (CST IV) sont associés à une présence accrue de cellules immunitaires au niveau des muqueuses, et une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires. Les cellules présentatrices d'antigène sont potentiellement directement activées par ces microbiotes et sécrètent des cytokines et des chimiokines à l'origine du recrutement de lymphocytes. Au niveau de la lumière vaginale, les bactéries produisent des SCFA, capable de moduler la réponse inflammatoire au niveau de la muqueuse, et différentes enzymes qui altèrent la couche de mucus (sialidase) et diminuent la quantité d'immunoglobulines. Certaines bactéries sont également capables de produire des biofilms. Modifiée à partir de Wira et al, 2015⁹.

De plus, chez les femmes atteintes de BV, la fréquence et l'activation des lymphocytes T CD4⁺ est supérieure. Les auteurs attribuent cette différence à la structure du LPS retrouvé au niveau local, qui varie en fonction des bactéries présentes dans les deux groupes et induit

plus ou moins bien l'activation du TLR4. Dans une autre étude¹⁹⁸, les auteurs montrent qu'au niveau des tissus cervicaux, la quantité de cellules CD45⁺ (et plus précisément de cellules CD3⁺, CD8⁺ et HLA-DR⁺) est inférieure chez les femmes atteintes de BV comparée aux femmes ayant un microbiote vaginal sain. En revanche, ce n'était pas le cas des cellules CD4⁺ et CCR5⁺.

Le rôle des métabolites microbiens sur le système immunitaire est encore largement méconnu. Le lactate, riche dans les microbiotes vaginaux dominés par les lactobacilles, est associé à une bonne santé vaginale. Les acides gras à chaîne courte (SCFA) sont plutôt associés à la dysbiose et à des conditions pathologiques, mais cette relation est encore débattue aujourd'hui²⁰⁷. Chez les femmes possédant un microbiote vaginal divers, pauvre en lactobacilles, les effets des bactéries du microbiote vaginal sur le système immunitaire sont notamment médiés par les SCFA, produits par ces bactéries, et qui impactent de manière importante les réponses immunitaires au niveau du TRF²⁰⁸. En revanche, les femmes possédant un microbiote vaginal riche en lactobacilles ont une faible concentration de SCFA au niveau vaginal, car ces bactéries n'en produisent pas²⁰⁸.

Le microbiote joue également un rôle dans la réponse immunitaire à la vaccination, notamment pour les vaccins qui visent à développer une immunité muqueuse. C'est pourquoi différentes populations, dont le microbiote intestinal diffère, présentent des réponses variables à la vaccination²⁰⁹. Un traitement antibiotique peut par ailleurs réduire l'efficacité de la réponse immunitaire au vaccin oral contre la poliomyélite, visant à développer une immunité muqueuse²¹⁰. Le microbiote vaginal pourrait également avoir un impact sur la réponse immunitaire à la vaccination.

De nombreuses études ont utilisé différentes espèces de lactobacilles en tant que probiotique pour prévenir le risque de vaginose bactérienne. Des études chez la souris montrent que l'administration de *L. acidophilus*, utilisé comme probiotique, a un impact sur la réponse immunitaire, en favorisant la différenciation des splénocytes en lymphocytes Treg plutôt qu'en Th17²¹¹. Chez la femme, des études exploratoires sont en cours pour tester l'efficacité de la transplantation du microbiote vaginal dans des protocoles de traitement de la BV²¹².

Au niveau du TRF, les relations entre le microbiote vaginal et les cellules immunitaires locales sont donc importantes puisqu'elles impactent la réponse immunitaire et l'inflammation. Les neutrophiles sont les principales cellules immunitaires présentes dans la lumière vaginale²¹³, cependant leur relation avec le microbiote vaginal est très peu décrite, contrairement par exemple aux relations entre le microbiote intestinal et les neutrophiles au niveau de la muqueuse intestinale²¹⁴. Pourtant, la plupart des mécanismes de régulation des neutrophiles décrits au niveau intestinal pourraient être transposés au niveau du TRF. Nous allons donc maintenant discuter de l'importance des relations entre le microbiote et les neutrophiles pour moduler l'inflammation au niveau du TRF (Figure 12).

Régulation des neutrophiles par le microbiote

Régulation de la production et de la maturation des neutrophiles

Le microbiote joue un rôle fondamental dans la production de neutrophiles : ceci a été montré au niveau intestinal (Figure 12). Chez des souris enceinte, le traitement antibiotique induit des altérations du microbiote intestinal chez les nouveau-nés. Après la naissance, les nouveau-nés qui continuent à recevoir des antibiotiques présentent une granulopoïèse altérée (diminution des neutrophiles de la moelle osseuse, du taux de G-CSF plasmatique et d'IL-17A dans l'intestin) par rapport aux souris naïves. La stimulation par le LPS peut restaurer la quantité de cellules productrices d'IL-17 dans l'intestin et la granulocytose. Les nouveau-nés exposés aux antibiotiques et traités avec le G-CSF présentent un nombre accru de neutrophiles circulants et une meilleure résistance à des infections bactériennes par rapport aux nouveau-nés exposés aux antibiotiques et non traités. Ces résultats montrent que le microbiote est essentiel à la production de neutrophiles²¹⁵.

Une étude de cohorte en Afrique du Sud a suivi des femmes atteintes de BV et traitées par métronidazole oral²¹⁶. Avant traitement, leur microbiote vaginal était dominé par des bactéries anaérobies et associé à une inflammation génitale. Après traitement, les auteurs ont observé une abondance réduite de bactéries associées à la BV (*G. vaginalis* et *A. vaginae*) et une augmentation de *L. iners*, associée de manière significative à une réduction du niveau de cytokines pro-inflammatoires.

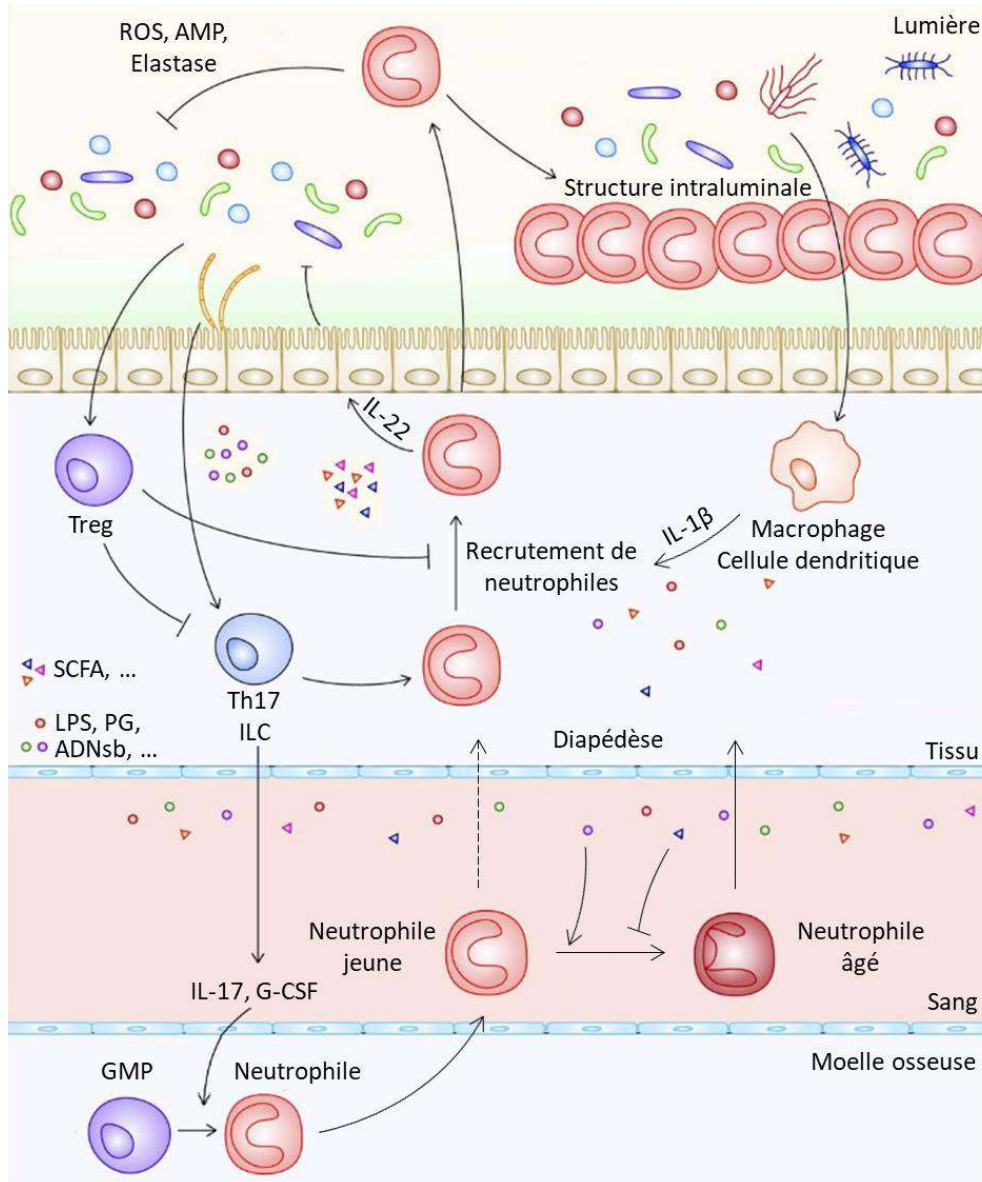


Figure 12 : Interaction entre les neutrophiles et le microbiote au niveau des muqueuses. Le microbiote produit des composants qui lui permettent de communiquer avec l'hôte. Ce dernier peut répondre aux stimulations du microbiote via l'engagement de neutrophiles. Les composants microbiens induisent la sécrétion d'IL-17, qui entraîne la synthèse de G-CSF et augmente la production et le recrutement de neutrophiles. Les différentes fonctions des neutrophiles empêchent alors la translocation et l'expansion des espèces commensales et pathogènes. Les macrophages et les cellules dendritiques du système muqueux produisent de l'IL1 β , et participent au recrutement des neutrophiles. À l'inverse, certains composant (SCFA) limitent les réponses inflammatoires en inhibant le recrutement des neutrophiles. Les produits microbiens peuvent diffuser dans la circulation sanguine et réguler la fonction des neutrophiles. Les neutrophiles jeunes présentent une activité pro-inflammatoire limitée. Au cours de leur vieillissement, ils acquièrent des capacités accrues de migration, d'activation, de production de ROS et de formation de NET. La détection de certains signaux dérivés du microbiote (LPS, PG, ...) dans la circulation sanguine peut favoriser ce phénomène. À l'inverse, d'autres métabolites dérivés du microbiote (SCFA, ...) présentent des propriétés anti-inflammatoires. GMP, progéniteurs granulocytes-monocytes ; ILC, cellule lymphoïde innée ; LPS, lipopolysaccharide ; PG, peptidoglycane. Modifiée à partir de Zhang et al, 2019²¹⁴.

Dans cette étude, le GM-CSF augmente après le traitement au métronidazole et semble être associé à l'abondance de *L. crispatus*. Le GM-CSF est connu pour induire le recrutement des neutrophiles et la différenciation des cellules hématopoïétiques en neutrophiles. Ce résultat pourrait donc suggérer que le microbiote vaginal a un impact sur la production et le recrutement de neutrophiles.

Régulation de la circulation des neutrophiles

La circulation circadienne des neutrophiles est également influencée par le microbiote (Figure 12). Chez les souris axéniques, l'infection pulmonaire à *K. pneumoniae* entraîne un recrutement limité des neutrophiles au niveau du site inflammatoire, favorisant la croissance du pathogène²¹⁷. La déplétion du microbiote chez la souris induit une réduction du nombre de neutrophiles âgés (CD62L⁻, CXCR4⁺) et de leur capacité d'adhésion et d'activation par rapport aux souris non traitées : les neutrophiles sont retenus dans la circulation sanguine²¹⁸. Ces phénomènes peuvent être partiellement corrigés par un traitement au LPS. Des souris *Knock Out* (KO) pour Myd88, TLR2 ou TLR4 présentent également des neutrophiles moins âgés, suggérant un rôle du microbiote dans la sensibilisation des neutrophiles²¹⁸. Chez les rats souffrant de colite, l'administration de *L. acidophilus* induit une diminution de la concentration de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, TNF α , IL-6) et immunorégulatrices (IL-4, IL-10). Les infiltrats de neutrophiles et de macrophages ainsi que la gravité des lésions étaient aussi réduits²¹⁹. Le microbiote pourrait avoir un effet local sur les cellules épithéliales conduisant au recrutement de neutrophiles, mais également avoir un effet distal via la sécrétion de métabolites diffusés dans le sang. En effet, il a été montré que de faibles concentrations de ligands de TLR tels que le LPS peuvent être détectés dans la moelle osseuse et induire un trafic de neutrophiles dans le sang. Il a également été démontré que les bactéries du microbiote intestinal peuvent produire des SCFA et pourraient avoir un impact sur le recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation²²⁰.

Régulation des fonctions des neutrophiles

Le microbiote peut également avoir une action directe ou indirecte (par exemple en modulant l'inflammation) sur les fonctions des neutrophiles (Figure 12). Les neutrophiles isolés de souris axéniques ou traitées aux antibiotiques présentent des fonctions antimicrobiennes réduites, telles qu'une diminution de l'activité de la myéloperoxydase²²¹,

de la capacité de phagocytose²²² ou une réduction de la formation de NET²¹⁸.

Les métabolites tels que les SCFA, l'acide lithocholique ou l'histamine sont produits par les microbiotes vaginaux divers et pauvres en lactobacilles²⁰⁸ et pourraient modifier la production de ROS ou l'activité de phagocytose des neutrophiles. Cet effet pourrait être médié par des histones désacétylases (HDAC) ou un récepteur couplé à la protéine G^{214,223}. Les SCFA produits dans le côlon par fermentation bactérienne de polysaccharides sont principalement composés de butyrate, de propionate et d'acétate. Le butyrate et le propionate inhibent les cytokines pro-inflammatoires (entre autres, TNF α) et la production d'oxyde nitrique par les neutrophiles stimulés par le LPS (dans un modèle rat). De plus, ces SCFA sont capables d'inhiber l'activation de HDAC et de NF- κ B, ce qui pourrait expliquer la diminution des cytokines pro-inflammatoires²²⁴. Dans un modèle murin d'endométrite, une dysbiose a été induite dans le microbiote intestinal et la colonisation utérine de *S. aureus* entraîne une inflammation de l'endomètre, associée à une charge bactérienne accrue dans l'utérus des souris et une faible réactivité des neutrophiles, notamment en termes de phagocytose²²⁵. La transplantation de microbiote fécal chez ces souris permet de contrecarrer ces effets. Les auteurs ont démontré que l'effet protecteur était dû aux SCFA présents dans les fèces des souris, qui diffusent dans le sang mais aussi dans les tissus utérins. L'impact du microbiote sur les neutrophiles a également été observé dans le vagin : R. Cheu et al. ont observé une activation des neutrophiles cervico-vaginaux, ainsi qu'une diminution de leur apoptose conduisant à une accumulation des neutrophiles dans le vagin de femmes atteintes de BV [Keystone 2018].

Régulation du microbiote par les neutrophiles

Les neutrophiles sont parmi les cellules immunitaires les plus abondantes dans la lumière vaginale^{213,226}. Ils sont rapidement recrutés au niveau de la muqueuse lors du processus inflammatoire, et sont donc cruciaux pour maintenir l'équilibre entre les bactéries commensales et pathogènes au niveau du microbiote vaginal (Figure 12).

Recrutement et activation des neutrophiles

Chez les femmes BV (+), un taux vaginal élevé d'IL-8 et d'IL-1 β a été corrélé à la présence de bactéries pathogènes, entraînant un nombre élevé de neutrophiles²²⁷. À l'inverse, il a été démontré que de nombreuses souches probiotiques de *Lactobacillus* induisent une réponse TLR faible par rapport à des bactéries pathogènes *in vitro*^{228,229}. Cela peut conduire à une activation différente des neutrophiles en fonction de la composition du microbiote vaginal. Par exemple, dans l'intestin, lors d'une dysbiose, la migration des neutrophiles vers la lumière est augmentée et les neutrophiles génèrent des structures qui encapsulent les micro-organismes et limitent leur contact avec l'épithélium²³⁰. Lors de la reconnaissance de PAMP, l'activation des neutrophiles entraîne l'augmentation de l'expression de divers marqueurs de surface (CD32a, CD11b, intégrine $\alpha_M\beta_2$...), impliqués dans les fonctions cytotoxiques des neutrophiles⁹⁸.

Régulation de la fonction des neutrophiles

Les neutrophiles peuvent générer de nombreuses réponses antimicrobiennes et ont un impact sur la composition du microbiote. Par exemple, lors de la reconnaissance des agents pathogènes, les neutrophiles peuvent produire divers AMP par la sécrétion de granules cytosoliques. Ces AMP sont importants pour contenir le microbiote⁹². Les souris déficientes en peptide antimicrobien lié à la cathéline (CRAMP), produit par les neutrophiles, présentent une dysbiose au niveau intestinal et dans la cavité buccale²³¹.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont également produites par les neutrophiles locaux dans le FRT¹⁰⁸ et contribuent d'une part à renforcer le stress oxydatif induit par la production d'H₂O₂ par les lactobacilles, aux effets bactéricides et bactériostatiques²³². D'autre part, les ROS favorisent la production de NET, capables de lier les agents pathogènes et facilitant leur destruction par les neutrophiles. Dans les poumons, la production de NET contribue à la protection contre les agents pathogènes²³³. Cependant, dans l'appareil reproducteur féminin, la formation exagérée de NET pourrait entraîner l'infertilité, car les NET peuvent également endommager les cellules endogènes. Les mucines cervicales ont été décrites comme ayant des propriétés anti-inflammatoires, conduisant à l'inhibition de la libération de NET²³⁴. Ainsi, le microbiote pourrait également avoir un effet direct ou indirect sur la production de NET, car par exemple dans l'intestin, il a été démontré que la

composition du microbiote régule l'expression de différentes mucines (MUC1, 4, 5 ...), également exprimées au niveau des muqueuses du TRF, de manière directe ou via la production de métabolites microbiens²³⁵.

En conclusion, les neutrophiles sont importants pour contrôler le microbiote vaginal et répondre aux agents pathogènes, mais il est également nécessaire de maintenir un équilibre entre le recrutement/l'activation des neutrophiles et la tolérance du microbiote pour prévenir divers problèmes de santé reproductive, notamment l'infertilité. Le microbiote produit également de nombreux composants et métabolites qui peuvent avoir un impact sur la production, la maturation et les fonctions des neutrophiles.

Le microbiote vaginal n'est pas le seul facteur de l'environnement du TRF qui impacte l'inflammation génitale. D'autres facteurs peuvent être présents au niveau du TRF, en condition physiologique ou pathologique. C'est par exemple le cas du LS lors de rapports sexuels non protégés.

3 LE LIQUIDE SEMINAL (LS)

Le sperme est un fluide complexe, dont la principale fonction est la reproduction²³⁶. Il est constitué de nombreuses cellules (principalement des spermatozoïdes) et d'une fraction acellulaire, le LS. Le LS est un milieu nutritif qui favorise la protection et le transport des spermatozoïdes, mais c'est également le principal vecteur d'un grand nombre d'IST et il est impliqué dans la modulation de la réponse immunitaire au niveau du TRF²³⁷.

3.1 Composition et propriétés du LS

Le volume de LS (95 à 98% du volume du sperme) est variable (3,6 mL/éjaculat en moyenne, mais le volume varie entre 3 et 6 mL) et est composé d'un mélange de sécrétions provenant de différents organes de l'appareil reproducteur masculin : testicules (1-2%), épидидymes (2-4%), vésicules séminales (65-75%), prostate (25-30%) et glandes de Cowper et Littré (<1%) (Figure 13)²³⁸.

L'éjaculat est fractionné en quatre phases : (1) pré-éjaculatoire, provenant des glandes de Cowper et Littré, qui jouent un rôle dans la lubrification pour l'écoulement du sperme (2) préliminaire (environ 30% du volume de l'éjaculat), provenant des épидидymes et des canaux déférents, cette fraction est riche en spermatozoïdes et en enzymes facilitant la liquéfaction du sperme, (3) principale, constituée des sécrétions prostatiques et des vésicules séminales, cette phase est impliquée dans la mobilité des spermatozoïdes (elle régule le coagulum séminal) et a des effets immunomodulateurs (4) la dernière phase (environ 70% éjaculat) provient principalement des vésicules séminales²³⁹.

3.1.1 Composition biochimique

Le LS est riche en citrate (5 mg/mL), fructose (3 mg/mL) et glucose (1 mg/mL), constituant un support nutritif important pour le métabolisme des spermatozoïdes²⁴⁰. De nombreuses hormones (prostaglandine E1/E2 (PGE), prolactine, testostérone, ...), métabolites (urée, acide lactique, à une concentration d'environ 0,5 mg/mL) et des sels minéraux (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , à une concentration inférieure à 0,3 mg/mL) sont aussi présents dans le LS²⁴¹. La PGE2, produite par les vésicules séminales, est présente en grande quantité dans le LS : elle est 100 000 fois plus concentrée par rapport aux niveaux observés dans les tissus lors d'une réponse inflammatoire aiguë²⁴².

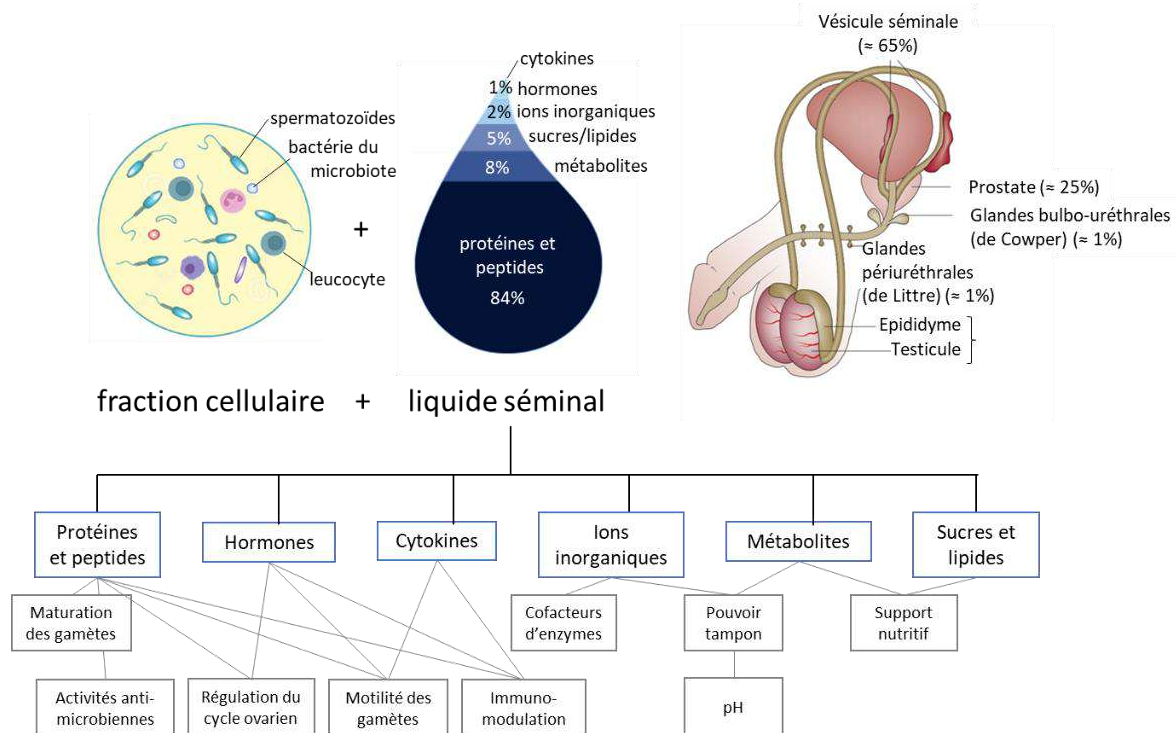


Figure 13 : Origine, composition et principales fonctions du liquide séminal. Le sperme est composé d'une fraction cellulaire et d'une fraction acellulaire (le liquide séminal). Le liquide séminal est produit par différents organes du tractus reproducteur masculin, majoritairement par les vésicules séminales et la prostate. Il est majoritairement composé de protéines. Les grandes fonctions des principaux composants du LS sont également représentées. Modifiée à partir de Drabovich et al., 2014 et Juyena et al., 2012^{243,244}.

Le LS est particulièrement riche en protéines (50 mg/mL), avec plus de 2500 protéines différentes identifiées (Tableau 2)²⁴⁵. Elles proviennent majoritairement des vésicules séminales (séménogélines, lactoferrine, fibronectine, *protein C-inhibitor*) et de la prostate (Antigène Spécifique de Prostate = PSA, Phosphatase Acide Prostatique = PAP, ...). Elles assurent de très nombreuses fonctions : maintien d'un milieu alcalin, nutrition et transport des spermatozoïdes, coagulation et liquéfaction de l'éjaculat, augmentation et inhibition de la motilité des spermatozoïdes, augmentation de la réponse immunitaire, interaction avec la zone pellucide, modulation de la réaction acrosomique, dégradation de la matrice extracellulaire, fusion avec la membrane ovocytaire... Ce sont des protéines de liaison, à activité catalytique (hydrolases, glycosylases, glycosidases, lipases), ou impliquées dans d'autres processus biologiques (métabolisme, régulation, communication cellulaire, transport, ...)²⁴³. Les protéines produites au niveau des différentes glandes permettent de maintenir un pH favorable et protègent l'épithélium et les spermatozoïdes contre l'urine.

Tableau 2 : Fonction des principaux composants du liquide séminal. Liste non exhaustive des composants du LS, de leur origine et fonctions. La liste se concentre sur les composants du LS les mieux décrits dans la littérature. Créé à partir de Samanta et al, 2018, Candenias et al, 2020 et Drabovich et al, 2014^{243,246,247}.

Origine	Composant	Fonctions (liste non exhaustive)
Vésicule séminale	Acides aminés	Support métabolique
	Fructose	Support métabolique
	Citrate	Nutrition, pH basique, pouvoir tampon
	Lipides (phosphorylcholine, ...)	Support métabolique
	Vitamines (flavines, ascorbates...)	Support métabolique
	HCO ₃ ⁻	pH basique, pouvoir tampon
	Prostaglandines	Immunomodulation
	TGFβ	Immunomodulation (tolérance)
	Protéines	
	Séménogéline	Viscosité du LS (formation du coagulum)
	Fibronectine	Viscosité du LS (formation du coagulum)
	Protein C-inhibitor	Liquéfaction du LS
	Mucines	Viscosité du LS
Prolactin-inducible protein	Liquéfaction du LS, immunomodulation	
Prostate	Citrate	Nutrition, pouvoir tampon
	Zn ²⁺	Support métabolique
	Lipides (cholestérol, acides gras, ...)	Support métabolique
	TGFβ, MIF	Immunomodulation
	HLA-G	Immunomodulation (tolérance)
	Prostasomes	Protection et fonctions des spermatozoïdes
	Protéines et peptides	
	Glutathione peroxydase	Diminution du stress oxydatif
	Molécules d'adhésion aux spermatozoïdes	Protection des spermatozoïdes
	Polyamines	Immunomodulation (antimicrobiens)
	Protéases (fibrinolyse, ...)	Liquéfaction, variété d'autres fonctions
	Kallikreïns (PSA= kallikrein 3)	Immunomodulation
	Prostatic acid phosphatase	Liquéfaction du LS
Zinc-α2-glycoprotein	Régulations métaboliques	

Glandes bulbo-urétrales et péri-urétrales	Galactose	Support métabolique
	Acide sialique	Viscosité du LS
	Anticorps	Immunomodulation
	Sécrétions colloïdales	Viscosité du LS
	Protéines mucineuses	Viscosité du LS
Epididymes et testicules	Hormones (activin B, testostérone, ...)	Modulation du système hormonal féminin
	Epididysomes	Protection et support aux fonctions des spermatozoïdes
	Protéines	
	TX101, ACRV1, ...	Support aux fonctions des spermatozoïdes
	Clusterine	Protection des spermatozoïdes
	Glutathione peroxidase	Diminution du stress oxydative
	PGD2 synthase	Synthèse de prostaglandine

Les protéines issues des vésicules séminales sont majoritairement des séménogélines (30 % de toutes les protéines sécrétées), qui peuvent subir un clivage protéolytique. Les protéines prostatiques sont notamment impliquées dans ce clivage protéolytique. Leurs produits de protéolyse sont impliqués dans de nombreuses fonctions : ils inhibent la motilité des spermatozoïdes et exercent une action antibactérienne²⁴⁸.

Le LS contient environ 1% de composés médiateurs de l'inflammation tels que des immunoglobulines, des molécules du complément, des cytokines et des chimiokines, des peptides antimicrobiens^{249,250}. Par exemple, le TGF β , produit principalement par les vésicules séminales, est présent en forte concentration (environ 200 ng/mL) dans le LS²⁵¹. Le LS contient aussi des exosomes (épididymosomes, prostasomes et vésiculosomes) aux propriétés immunomodulatrices²⁴⁶. Les fonctions de tous ces composants sont plus ou moins bien décrits dans la littérature, et pour certaines, leur rôle dans la sélection des spermatozoïdes, la fonction et la signalisation de la fertilité au niveau du TRF, ainsi que les effets à long terme sur la santé sexuelle ne sont pas connus (Figure 13 et Tableau 2)²⁵².

3.1.2 Propriétés biochimiques

Le liquide séminal est un fluide complexe, composé majoritairement d'eau, de protéines, de métabolites et d'ions²⁴⁰. La présence de ces composés confère au LS un pH basique (7,7 en

moyenne, mais le pH peut être compris entre 7,4 et 8,4) même dans l'environnement vaginal acide²⁵³. C'est le fluide biologique qui possède le plus fort pouvoir tampon ($25 \beta = \frac{\Delta[\text{base}]}{\Delta\text{pH}}$), notamment grâce à sa forte concentration en ions citrate, bicarbonate, pyruvate et phosphate²⁵⁴. La forte concentration en anions favorise la formation de nombreux complexes entre anions et protéines ou anions et sels minéraux, et maintient la solubilisation de ces composés dans le LS. Le LS est également caractérisé par une forte osmolarité (354 mOsm, en comparaison, le plasma a une osmolarité inférieure à 300 mOsm) et viscosité (3-7 cP, en comparaison, l'eau a une viscosité de 0,1 cP). Au sein du vagin, différents facteurs de coagulation produits par les vésicules séminales (séménogélines et fibronectine) permettent rapidement la formation d'un coagulum, assurant la rétention du sperme dans la cavité vaginale²⁵⁵. Quelques minutes suivant l'éjaculation, des protéases produites par la prostate (PAP et PSA) assurent la liquéfaction du coagulum et la libération des spermatozoïdes.

3.2 Facteurs influençant le LS

De nombreux facteurs (génétiques ou environnementaux) influencent la composition du liquide séminal : l'origine ethnique, les pratiques sexuelles, la température, l'alimentation, le stress... (Figure 14).

3.2.1 Facteurs génétiques

De nombreux gènes sont impliqués dans la synthèse du LS et ont donc un impact sur sa composition. Des mutations de ces gènes peuvent être à l'origine de problèmes d'infertilité masculine : près de 200 maladies génétiques relative à l'infertilité masculine ont été décrites²⁵⁶. Les facteurs génétiques à l'origine de l'infertilité masculine sont classés en trois catégories : pré-testiculaire, testiculaire et post-testiculaire. Plusieurs de ces maladies, notamment post-testiculaires (fibrose kystique, absence bilatérale congénitale du canal déférent, ...) sont associées à des altérations des paramètres spermatiques, mais également du liquide séminal^{257,258}.

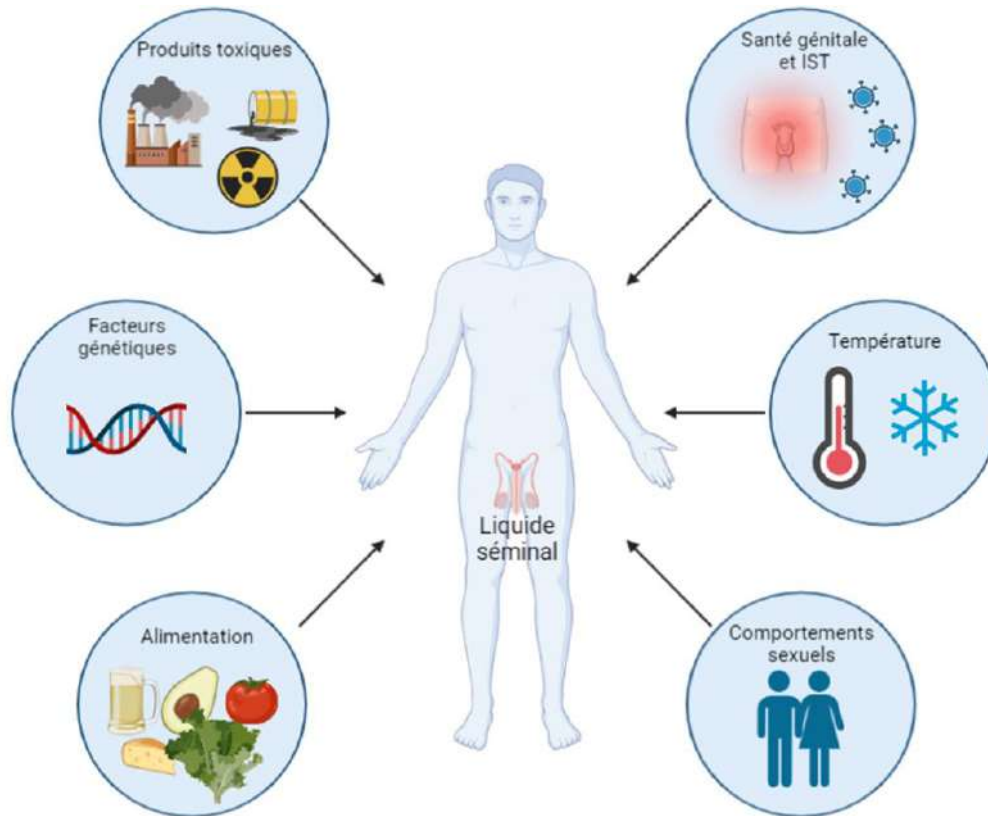


Figure 14 : Facteurs influençant la composition du liquide séminal. Les différents facteurs génétiques ou environnementaux (température, pollution, alimentations, pratiques sexuelles, ...) pouvant modifier la composition du liquide séminal sont représentés. Créée sur Biorender.com.

Une étude de cohorte a par ailleurs montré que chez des hommes souffrant d'infertilité, des altérations de différents marqueurs biochimiques et immunologiques dans le LS sont présents, quelle que soit la cause de l'infertilité, génétique ou environnementale²⁵⁹.

3.2.2 Facteurs environnementaux

Différents facteurs de l'environnement ont un impact sur la composition du LS. De nombreuses études ont montré les effets néfastes de la pollution de l'air sur la qualité du sperme, ou plus généralement de composants chimiques nocifs²⁶⁰. En effet, chez les personnes exposées à des polluants, ces composés polluants sont retrouvés au niveau du LS²⁶¹, ainsi qu'une diminution du volume du LS²⁶².

Le régime alimentaire a un impact sur la composition du LS : une étude chez la souris a montré que le liquide séminal issu de souris nourries avec un régime faible en protéines diffère par rapport à des souris nourries avec un régime alimentaire de référence²⁶³.

La température est aussi un facteur important qui impacte de manière réversible la

composition du LS : une température élevée au niveau du scrotum entraîne l'augmentation du métabolisme testiculaire sans augmentation de l'apport sanguin et mène à une hypoxie tissulaire suivie d'une augmentation du stress oxydatif par production de ROS²⁶⁴. Par ailleurs, une température élevée entraîne également une diminution de la concentration de protéines dans le LS²⁶⁵.

L'inflammation génitale peut également affecter la composition du LS, toujours en lien avec le stress oxydatif. L'inflammation peut conduire à une production de ROS et modifie la composition du LS, notamment en termes de concentration en protéines²⁶⁶. Par ailleurs, en condition inflammatoire, le LS contient également une plus forte concentration de cytokines pro-inflammatoires²⁶⁷.

Par ailleurs, les comportements sexuels ont aussi un impact sur la composition LS : la quantité de différentes cytokines (TGF β , IFN γ et CXCL8) et de certaines hormones (activine A et follistatine) augmente dans le LS avec la durée d'abstinence^{268,269}.

Le microbiote du sperme a aussi une influence sur la composition du LS : les différents micro-organismes présents dans le sperme corrént avec la qualité du sperme, et peuvent produire différents métabolites, retrouvés dans le liquide séminal^{190,270}. Par ailleurs, le microbiote vaginal peut également avoir un impact indirect sur la composition du liquide séminal après un rapport sexuel, puisqu'il peut influencer la composition du microbiote du sperme.

3.3 Impact du LS sur le système immunitaire

Le LS contient de nombreuses cytokines impliquées dans la régulation du recrutement, de la maturation ou de la prolifération des neutrophiles, des monocytes/macrophages, des lymphocytes T, lymphocytes B, DC et cellules NK. Il agit également au niveau des cellules épithéliales du TRF²⁷¹. La réponse immunitaire du TRF au LS est complexe (Figure 15). Elle a lieu en différentes étapes et dépend de nombreux paramètres tels que la composition du LS, le nombre de fois où la muqueuse a déjà été exposée au LS, etc... Une revue récente reprend de manière exhaustive la réponse du TRF au LS²⁵⁵.

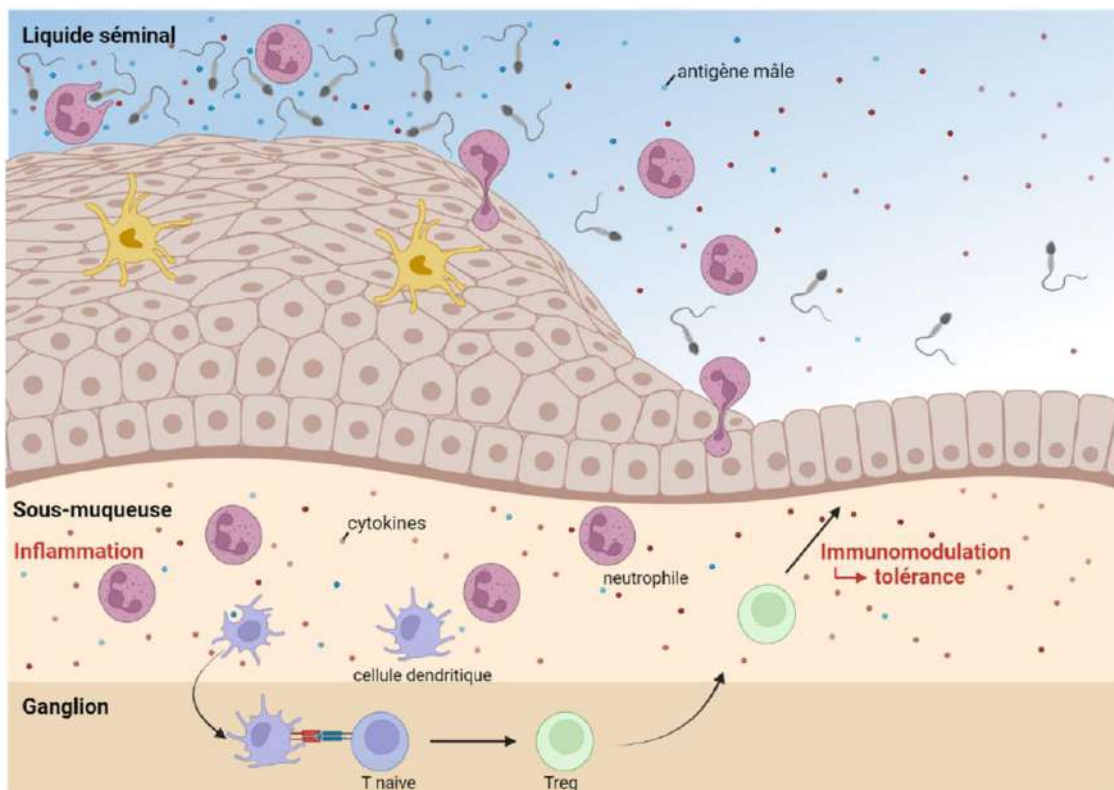


Figure 15 : Impact du sperme au niveau des muqueuses du TRF. Le LS provoque une variété de réponses au niveau du TRF. Il induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales du TRF. Ces cytokines entraînent le recrutement et l'activation des cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles). Les neutrophiles peuvent traverser l'épithélium de l'utérus et éliminer les micro-organismes et des spermatozoïdes non fonctionnels introduits dans la lumière. Les cellules présentatrices d'antigène prennent en charge des antigènes masculins au niveau des muqueuses du TRF, dans un contexte tolérogénique favorisé par les cytokines présentes au niveau du LS. Après leur migration dans le ganglion lymphatique drainant, ils favorisent la polarisation de cellules T régulatrices qui interviennent dans la tolérance des antigènes paternels. Créée sur Biorender.com.

Impact au niveau des muqueuses du TRF

Le LS agit au niveau des cellules épithéliales vaginales ou cervicales en entraînant une production de nombreuses cytokines/chimiokines (IL-8, IL-6, CCL20, GM-CSF, CCL2, IL-1 α , IL-1 β , Gro α , MIP-2 α , MIP-2 β), ce qui favorise le recrutement de neutrophiles, macrophages et lymphocytes T au niveau du col de l'utérus²⁷². Deux études mettent en évidence qu'une exposition récente au sperme est associée à une concentration élevée de différentes cytokines (IL-6, TNF α , CXCL10 ou CCL5) au niveau des fluides cervicovaginaux, et que cette concentration diminue ensuite trois à cinq jours post-exposition^{273,274}.

Chez le porc ou le cheval, le LS a également un impact au niveau de l'utérus et favorise

d'une part une inflammation entraînant le remodelage de l'endomètre utérin, et d'autre part, une modulation de réponses immunitaires favorisant la tolérance²⁷⁵. Dans différents modèles animaux l'effet du LS est également médié par d'autres composants présents dans le LS, tels que les exosomes²⁷⁶, ou encore des hormones²⁷⁷. Une étude chez la souris a mis en évidence qu'à la suite d'une exposition à du LS, l'expression de plus de 300 gènes est modifiée au niveau de l'utérus²⁷⁸. Ces gènes sont majoritairement impliqués dans des voies de signalisation permettant la régulation de la réponse immunitaire. Chez des souris déficientes en vésicules séminales, la quantité de LS est fortement réduite et l'insémination du sperme au niveau du TRF entraîne l'absence de réaction inflammatoire au niveau de l'utérus²⁷⁹. La forte inflammation au niveau de l'utérus serait principalement médiée par les lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17A²⁸⁰. Le LS est particulièrement riche en facteurs immunosuppresseurs (TGF β , PGE, ...), qui contribuent à l'établissement de la tolérance aux antigènes masculins au niveau du TRF. Le TGF β est présent en grande quantité sous forme complexée dans le LS. Sa forme active est libérée dans le vagin après dégradation des protéines de liaison par des enzymes présentes dans les sécrétions vaginales²⁸¹. Le TGF β modifie aussi la distribution de protéines impliquées dans les jonctions serrées au niveau de l'épithélium (occludine, claudin-7), ce qui diminue également l'intégrité de la barrière épithéliale²⁸². Les prostaglandines favorisent aussi un environnement anti-inflammatoire en diminuant la production d'IL-12 et en augmentant la production d'IL-10 par les DC. Cependant, au niveau des cellules épithéliales cervicales, elles pourraient favoriser au contraire la production de cytokines pro-inflammatoires²⁸³. Les prostaglandines agissent aussi au niveau des cellules épithéliales en augmentant l'expression de la cyclooxygénase (COX-2), ce qui favorise une inflammation locale²⁸⁴.

Impact au niveau des cellules immunitaires innées

L'augmentation de la quantité de cytokines pro-inflammatoires conduit à l'infiltration des APC et de neutrophiles²⁷¹. Chez le porc, les spermadhésines, protéines présentes dans le LS, favorisent également le recrutement des neutrophiles²⁸⁵. L'infiltration des neutrophiles est rapide à la suite de l'insémination (le pic de recrutement a lieu en quelques heures), et leur action au sein de la muqueuse est de courte durée (leur fréquence au sein du TRF diminue dès 24h post-insémination)²⁷⁵. Les neutrophiles activés relarguent des NET qui agissent sur

les bactéries du microbiote vaginal et sur les spermatozoïdes présents dans le LS²⁸⁶. Avant de féconder l'ovule, les spermatozoïdes doivent rencontrer un grand nombre de neutrophiles, ce qui assure une sélection des spermatozoïdes les plus fonctionnels, donc au meilleur potentiel génétique²⁷¹. Le LS assure une protection des gamètes contre la forte inflammation locale et pourrait favoriser cette sélection entre les spermatozoïdes²⁷⁵. Par exemple, chez les équidés, il contient des DNases, capable de lyser les NET qui entravent les spermatozoïdes²⁸⁷. Par ailleurs, CRISP3, une protéine présente dans le LS peut moduler les fonctions des neutrophiles²⁸⁸. D'autres modèles *in vitro* chez les bovins montrent que le LS peut bloquer l'infiltration des neutrophiles induite par l'IL-8 au niveau des cellules épithéliales endométriales et réduit également leur capacité à produire des ROS^{289,290}. Une étude a comparé le recrutement de neutrophiles au niveau du TRF suite à une insémination avec du LS pur, ou dilué en PBS²⁹¹. Si la dilution du LS n'a pas d'impact sur le recrutement des neutrophiles 6 ou 12h après l'insémination, elle pourrait induire une augmentation de la présence des neutrophiles 24h post-insémination et donc réduire la durée de la période pro-inflammatoire. Le LS contrôle aussi l'expression de MMPs par les neutrophiles et les macrophages et assure donc le remodelage de la matrice extracellulaire de la muqueuse utérine²⁹². Le LS module également le phénotype et/ou la fonction des macrophages, des DC et des cellules NK au niveau du TRF (pour revue, voir Schjenken et al, 2020). Par exemple, le LS oriente la différenciation des DC vers un phénotype tolérogénique, sécréteur d'IL-10 et de TGFβ²⁹³.

Impact au niveau de la réponse immunitaire adaptative

L'exposition au sperme induit un recrutement de lymphocytes T et de cellules dendritiques²⁷³. Les APC recrutés après insémination peuvent ensuite présenter les antigènes masculins aux lymphocytes T naïfs présents localement, ou possiblement dans les LN iliaques, après leur migration dans ces derniers²⁹⁴. Les DC tolérogéniques favorisent alors la formation de Treg²⁹⁵. Chez le porc, des protéines du LS (spermadhésines) peuvent également induire le recrutement de lymphocytes au niveau du TRF²⁸⁵. La réaction pro-inflammatoire décrite précédemment se transforme alors en réaction anti-inflammatoire, favorisant la tolérance²⁹⁶. Le TGFβ présent localement agit au niveau des cellules immunitaires locales en induisant la différenciation et l'expansion des Treg²⁹⁷. La PGE2

inhibe également l'expansion clonale, la capacité cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK, et induit la polarisation des T CD4⁺ vers un phénotype Th2²⁸⁴. Cela favorise l'induction de la tolérance des lymphocytes T maternels aux antigènes présents dans le LS^{298,299}.

Des études montrent également un rôle du LS dans la réponse à la vaccination. Dans ces études, le LS renforce les réponses immunitaires T à la vaccination systémique au niveau du TRF^{300,301}. Les mécanismes expliquant cet effet ne sont cependant pas décrits à ce jour.

Pour résumer, le LS induit une réponse complexe au niveau du TRF, permettant d'éliminer les microorganismes et les spermatozoïdes superflus dans la partie basse du TRF, tout en assurant un environnement inflammatoire favorable à la tolérance dans l'optique d'une éventuelle implantation d'un embryon au niveau de l'utérus²⁵⁵.

Conséquences pour l'acquisition d'IST

Le sperme est un facteur clé de la transmission hétérosexuelle d'IST, puisque la transmission d'IST telles que le VIH-1 ou HSV-2 est plus efficace de l'homme vers la femme que de la femme vers l'homme^{302,303}. De nombreux facteurs présents dans le LS jouent un rôle dans la susceptibilité du TRF aux IST, de manière directe ou indirecte (par exemple en modifiant l'inflammation). Le LS a un impact sur la transmission de nombreuses IST, dont une quinzaine d'agents viraux (dont le VIH-1, le virus de l'herpès simplex 2 (HSV-2), les papillomavirus humains, le virus de l'hépatite B, ...) au niveau du TRF, mais la plupart des études existantes portent sur la susceptibilité au VIH-1³⁰⁴. La susceptibilité au VIH-1 est étroitement liée à la charge virale dans le LS³⁰⁵, qui dépend de différents facteurs, dont l'inflammation séminale, qui augmente la réplication virale^{306,307}. Les principaux effets des composants du LS sur la transmission des IST virales est résumé Figure 16.

Effets inhibiteurs des composants du LS sur les IST

Certains facteurs du LS diminuent la susceptibilité aux IST : c'est le cas des différents peptides antimicrobiens (polypeptides cationiques tels que SLPI ou les défensines, lactoferrine), des exosomes, retrouvés dans le LS et dont les propriétés antimicrobiennes ont été décrites précédemment²⁵⁵. Les prostasomes en particulier bloquent la liaison de différents virus transmis sexuellement (cytomégalovirus, virus ZIKA, de la Dengue, du Nil occidental), à leur cellules cibles et inhibent la transcription du VIH-1 et sa transmission de

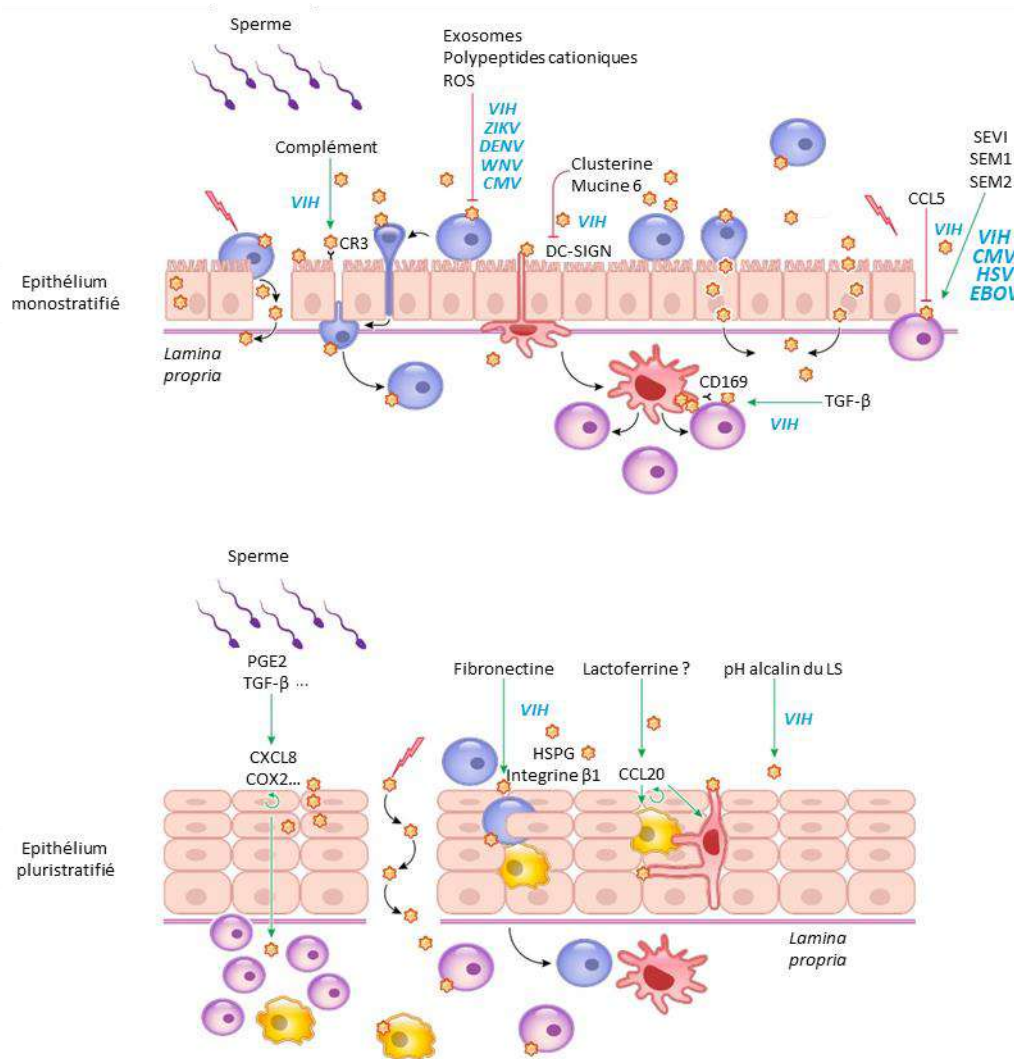


Figure 16 : Modulation de la transmission sexuelle des virus à travers l'épithélium du TRF par les composants du LS. Plusieurs composants du sperme facilitent (flèches vertes) ou inhibent (barres rouges) la transmission virale. ROS, espèces réactives de l'oxygène ; TGF-β, facteur de croissance transformant-β ; PGE2, prostaglandine E2 ; HSPG, protéoglycanes à héparane sulfate ; ZIKV, virus Zika ; DENV, Virus de la dengue ; WNV, virus du Nil occidental ; CMV, cytomegalovirus ; EBOV, virus Ebola (modifiée à partir de Le Tortorec et al., 2020).

cellule à cellule³⁰⁴. Le LS contient également des ROS produits notamment par les neutrophiles et les macrophages présents dans le sperme, qui peuvent modifier les structures membranaires des virus enveloppés tels que le VIH-1 et inhiber l'entrée virale³⁰⁴. La présence dans le LS de concentrations élevées de certaines cytokines inhibant le cycle du VIH-1 (voir Tableau 3) permet également de limiter son acquisition au niveau du TRF. Des études sur le VIH-1 ont montré que le LS pouvait inhiber l'interaction du virus au niveau de récepteurs sur les cellules cibles³⁰⁸ : *in vitro*, le LS diminue l'expression de CD4 à la surface

des lymphocytes T, ainsi que leur activation et leur prolifération. La clusterine ou la mucine 6 (des ligands de DC-SIGN) sont quant à eux responsables de l'inhibition de la capture nombreux agents viraux d'IST par les cellules dendritiques^{304,309}. Chez les personnes séropositives, il existe également des anticorps neutralisants au niveau du LS, capables de bloquer le VIH-1 par opsonisation ou par mort cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)³¹⁰.

Effets facilitateurs des composants du LS sur les IST

D'autres facteurs présents dans le LS ont un effet facilitateur pour l'acquisition d'IST. Tout d'abord, le pH alcalin du LS et son pouvoir tampon élevé permettent de protéger les agents d'IST tels que le VIH-1 de l'environnement vaginal acide³⁰⁴. Ensuite, l'opsonisation par les anticorps décrit ci-dessus ou encore par des molécules du complément présentes dans le LS pourrait faciliter l'infection en favorisant l'interaction du virus avec les cellules immunitaires^{310,311}. De même, la présence de différentes cytokines dans le LS (voir Tableau 3) peut augmenter la réplication du VIH-1. En particulier, le LS contient des concentrations élevées de TGF β et de PGE2, qui inhibent entre autres l'activation des lymphocytes et favorise leur polarisation en T_{reg}³⁰⁴. *In vitro*, le TGF β augmente l'expression de CD169 à la surface des DC, ce qui facilite l'attachement du VIH-1 aux DC³¹². Des fibrilles amyloïdes présentes en grande quantité dans le coagulum après l'éjaculation sont aussi connues pour augmenter l'infection du VIH-1 : ces fibres sont formées à partir des produits protéolytiques de PAP (*Semen-derived Enhancer of Viral Infection, SEVI*) ou des séménogélines 1 et 2³¹³. Ces fibrilles sont riches en acides aminés chargés positivement et favorisent l'interaction entre la surface des membranes du virus et de la cellule cible, chargées négativement. Différentes études ont montré qu'elles facilitent l'acquisition d'autres virus sexuellement transmissibles tels que le VIH-2, le HSV, le cytomégalovirus, ou le virus EBOLA. La fibronectine, abondante dans le LS, peut recouvrir les virions du VIH-1 et être reconnue par les cellules épithéliales du TRF (via l'intégrine β 1 ou les protéoglycanes à héparane sulfate), favorisant ainsi l'adhésion des virions à l'épithélium du TRF et les protégeant de la dégradation³⁰⁴.

A l'inverse, les IST ont un impact sur la composition du LS : dans le cas de l'infection par VIH-1, un relargage de VIH-1 dans le sperme a été observé chez 25% à 44% des hommes asymptomatiques, et leur LS présente une augmentation de cytokines pro-inflammatoires³¹⁴. Cette composition cytokinique différentes au niveau du LS chez des hommes infectés par le VIH-1 peut modifier l'impact du LS sur la susceptibilité aux IST³¹⁵.

Différents paramètres spermatiques sont également altérés chez les hommes au stade SIDA (augmentation du pH, diminution du volume de l'éjaculat, du nombre, de la mobilité et altération de la morphologie des spermatozoïdes, altération du nombre et des fonctions des leucocytes présents dans le sperme)^{316,317}. Suite à l'infection par le VIH-1, l'augmentation de la quantité d'IFN γ dans le LS pourrait être à l'origine de modifications des propriétés immunomodulatrices du LS, et pourraient altérer l'adaptation immunitaire lors de la grossesse chez la femme, à l'origine d'échecs de conception³¹⁸.

De nombreux pathogènes envahissent leur hôte à partir des muqueuses. Lors de la transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme, le TRF est la porte d'entrée principale des IST. Au niveau du TRF, les facteurs de l'environnement peuvent moduler la susceptibilité aux pathogènes. L'infection par *Chlamydia trachomatis*, comme toutes les IST, peut être transmise au niveau du TRF lors d'un contact sexuel (transmission génitogénitale ou anogénitale) ou pendant des préliminaires (transmission buccogénitale).

4 **CHLAMYDIA TRACHOMATIS (CT), L'IST BACTERIENNE MAJORITAIRE CHEZ LES JEUNES FEMMES**

4.1 Epidémiologie

L. Newman et al, ont estimé à 131 millions le nombre de nouveaux cas de chlamydioses dans le monde en 2012³¹⁹. En 2019, l'incidence de la chlamydie a augmenté en Europe avec 434 184 cas rapportés contre 397 613 en 2015 selon le Centre Européen pour la Prévention des Maladies, ce qui faisait de CT la cause majoritaire des IST en Europe^{3,320}. La chlamydie est principalement observée chez les jeunes femmes adultes hétérosexuelles. Chez les femmes âgées de 15 à 49 ans, la prévalence au niveau mondial de la chlamydie entre 2005 et 2012 était estimée à 4,2%³¹⁹. Dans une cohorte australienne, le taux d'incidence pour une primo-infection à CT était de 4,4 pour 100 habitants/an, avec un risque cumulatif de réinfection de 22,3 pour 100 habitants/an³²¹. Cette cohorte illustre un problème important concernant les IST : l'infection par un pathogène n'est pas nécessairement associé à une réponse protectrice de l'hôte et au contraire, lors de réexpositions au même pathogène, les individus risquent plus la réinfection. En Europe, ce sont les femmes âgées de 20 à 24 ans qui présentent la plus forte incidence à CT (1,4 cas pour 100 habitants), suivi par les femmes âgées de 15 à 19 ans (1,1 cas pour 100 habitants)³²². En France, comme en Europe, le taux d'infection urogénitale à CT a augmenté de manière régulière entre 2010 et 2017 (d'environ 20%)³²³. En 2019 et 2020, d'après Santé Publique France, plus de 150 000 français ont été diagnostiqués avec une infection CT. Il faut néanmoins préciser que cette hausse de la prévalence est en partie liée à une augmentation massive du diagnostic.

4.2 Cycle de vie, physiopathologie et traitement

CT est une bactérie intracellulaire obligatoire Gram (-). Elle fait partie de la famille des *Chlamydiaceae* et du genre *Chlamydia*³²⁴. L'espèce *C. trachomatis* est divisée en 19 sérovars : les sérovars A-C sont impliqués dans des infections oculaires, les sérovars D-K sont impliqués dans des infections urogénitales mais induisent également des conjonctivites, et les sérovars L1-L3 sont impliqués dans des infections du système lymphatique et causent la lymphogranulomatose vénérienne (LGV), plus fréquemment retrouvée chez les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes que chez les femmes³²⁵. CT infecte

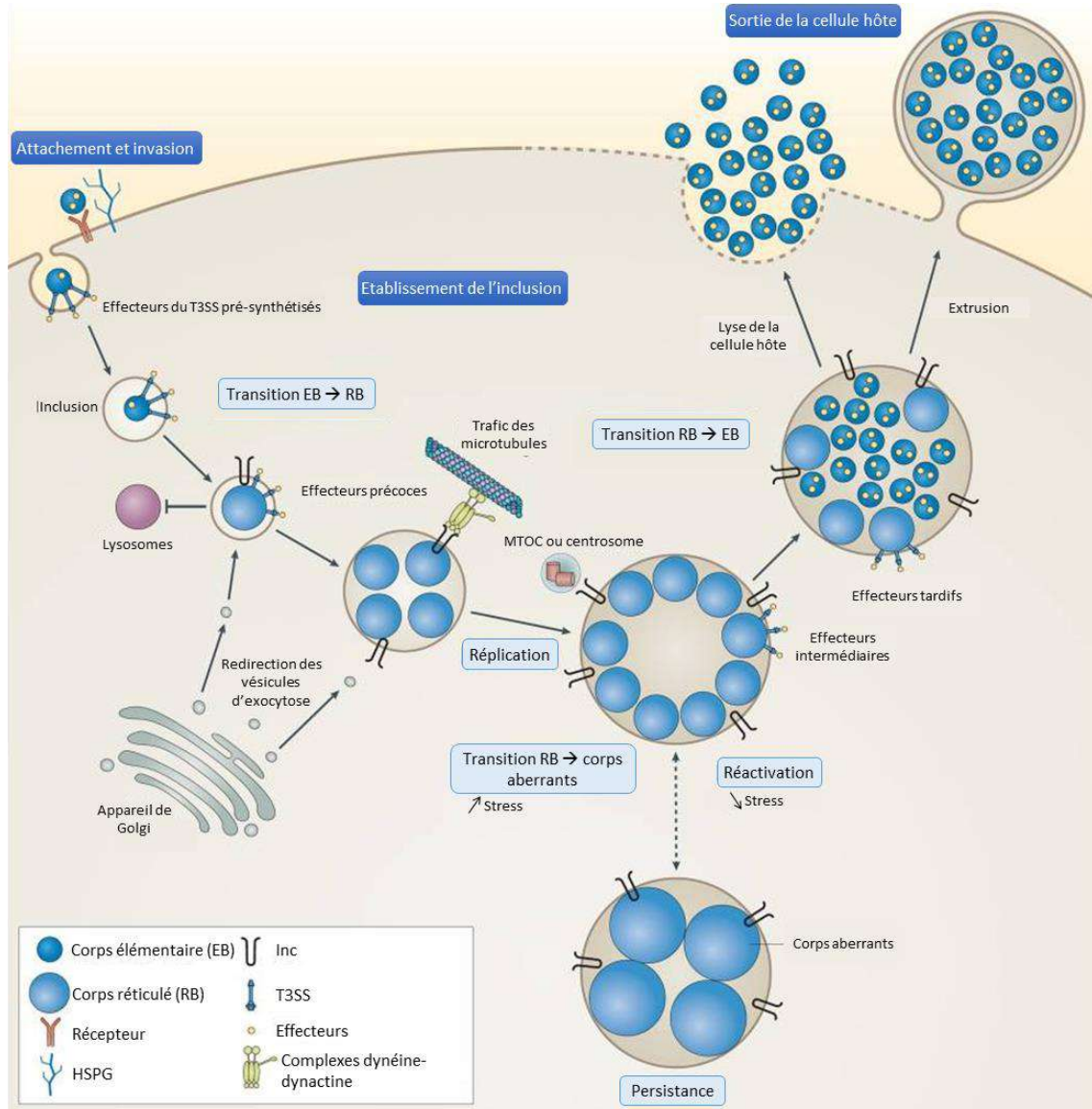
principalement les cellules épithéliales, mais peut également infecter les macrophages. CT a un cycle de développement biphasique qui alterne entre deux formes : les corps élémentaires (EB) qui sont infectieux mais non métaboliquement actifs, et les corps réticulés (RB) qui sont métaboliquement actifs, donc capables de se répliquer, mais non infectieux (Figure 17)³²⁶.

Cycle de multiplication

L'adhésion des EB à la cellule hôte est initiée grâce aux adhésines bactériennes et aux protéoglycanes héparane sulfate de la cellule hôte. Suite à la liaison des EB aux récepteurs cellulaires, des effecteurs bactériens sont injectés dans la cellule via un système de sécrétion de type III³²⁷. Des réarrangements du cytosquelette permettent l'internalisation des EB. Les EB sont internalisés dans un compartiment appelé inclusion, qui se dissocie rapidement de la voie endolysosomale³²⁸. La synthèse des protéines bactériennes commence et les EB se transforment en RB. Les protéines bactériennes synthétisées (Inc) favorisent l'acquisition des nutriments et modulent les processus de la cellule hôte en favorisant par exemple sa survie³²⁹. Les RB se répliquent de manière exponentielle. Au cours des derniers stades de l'infection, les RB sécrètent des effecteurs de fin de cycle et se différencient en corps élémentaires. L'inclusion est maintenant pleine d'EB et remplit presque tout le volume de la cellule. Les corps élémentaires sortent de l'hôte par lyse ou extrusion et peuvent infecter d'autres cellules³²⁴.

Physiopathologie

Les différentes espèces de *Chlamydia* sont connues pour entraîner des infections persistantes en l'absence de traitement ou des réinfections en cas d'élimination de la bactérie (naturelle ou suite à un traitement antibiotique) (Figure 18)³³⁰. L'infection persistante peut entraîner une inflammation chronique, la destruction des cellules infectées, une prolifération cellulaire et le remodelage du tissu^{331,332}. 70 à 90% des personnes infectées par CT sont asymptomatiques ou paucisymptomatiques et souvent non traitées, ce qui participe à la propagation de l'infection³²⁵. Pour 20 à 54% des patients infectés et non traités, l'infection se résout de manière spontanée dans l'année. En revanche, pour 23 à 30% des patients, des réactivation ou réinfections à CT provoquent une inflammation chronique au niveau génital et mènent à l'apparition de divers symptômes plus ou moins sévères.



Chez la femme, ces symptômes peuvent inclure une cervicite avec leucorrhée (inflammation du col de l'utérus avec écoulements vaginaux anormaux), des cystalgies (douleurs de la vessie), un syndrome urétral, une dyspareunie (douleurs lors ou après les rapports sexuels),

des saignements entre les règles ou après rapports vaginaux. Les formes aiguës de la chlamydie incluent des douleurs pelviennes ou des métrorragies (saignements entre les règles). Non traitée, l'infection peut progresser vers les voies génitales supérieures et induire une maladie inflammatoire pelvienne (20 à 40 % des symptômes induits par l'infection) causant des douleurs pelviennes, la stérilité, ou encore des grossesses extra-utérines. Chez la femme enceinte, l'infection peut être transmise au nouveau-né lors de l'accouchement. La LGV, également induite par CT, se caractérise par des ulcérations génitales suivies d'adénopathies et d'une inflammation du rectum/anus^{333,334}.

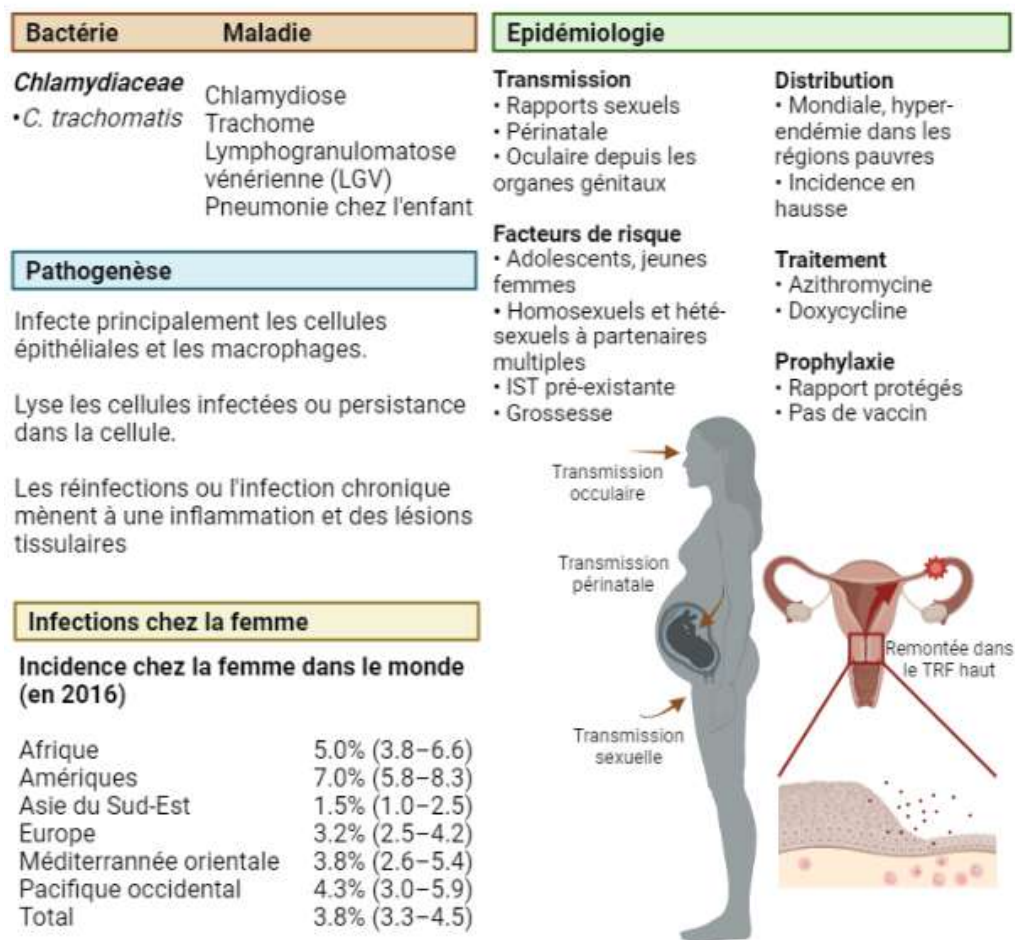


Figure 18 : Maladie, épidémiologie et pathogénèse dues à *C. trachomatis*. Représentation des faits clés sur la pathogénèse due à *C. trachomatis*. Section « Bactérie et Maladie » : Agent causal et maladies associées. Section « Épidémiologie » : description de la transmission de la bactérie, sa distribution dans le monde, les personnes à risque ou les facteurs de risque, ainsi que les vaccins ou les médicaments actuellement disponibles. Section « Pathogénèse » : Vision simplifiée reflétant l'infection et la pathogénèse. Les flèches indiquent les portes d'entrée dans le corps humain. Section « Infections chez la femme » : Incidence de l'infection dans le monde. Créée sur Biorender.com.

Prophylaxie et traitement

Plusieurs études cliniques sont en cours dans le cadre de l'élaboration d'un vaccin contre CT, mais à ce jour aucun n'est approuvé par la *Food and Drug Administration* ou l'agence européenne du médicament pour une utilisation chez l'Homme³³⁵. Malgré de bonnes réponses protectrices obtenues suite à certains essais cliniques, certains individus immunisés présentent une exacerbation de la maladie, ce qui empêche pour le moment la commercialisation du vaccin³³⁶. Les stratégies visant à proposer largement le dépistage et la notification des partenaires sont efficaces pour prévenir l'infection à CT³³⁷.

Le traitement de référence de l'infection par CT est l'azithromycine en une dose³³⁸. La LGV est traitée avec la doxycycline, pendant 3 à 4 semaines³³⁹. Cependant, les stratégies de traitement de l'infection CT font actuellement l'objet d'essais cliniques, notamment pour le traitement de l'infection rectale et sont donc susceptibles d'évoluer³⁴⁰.

4.3 Réponse immunitaire à l'infection CT

4.3.1 Réponse innée

Les cellules épithéliales jouent un rôle crucial dans l'élaboration de la réponse immunitaire précoce à l'infection CT (Figure 19, 20A)³⁴¹. L'infection par CT des cellules épithéliales endocervicales déclenche l'activation de PRR (Figure 19)³⁴²⁻³⁴⁵ puis induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires³²⁵. Des études *in vitro* montrent une forte variabilité concernant les cytokines exprimées³⁴⁶⁻³⁴⁸ : par exemple, l'infection par CT d'un modèle de cellules HeLa (lignée cellulaire dérivée d'une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus) induit une production d'IL-8, GM-CSF, IL-6 et IL-1 α , alors que dans un modèle de cellules A2EN polarisées (lignée de cellules épithéliales endocervicales humaines), l'expression de cytokines pro-inflammatoires est plus faible avec notamment une diminution de CXCL10 et CCL5^{349,350}. La nature des cytokines produites lors d'une infection CT semble donc dépendre des paramètres expérimentaux utilisés (modèle cellulaire, multiplicité d'infection (MOI), durée d'infection, ...). Dans différents modèles *in vitro*, l'infection CT entraîne l'activation de PRR membranaires³⁵¹ et surtout cytosoliques, à l'origine de l'activation de la caspase-1^{352,353}. L'activation de cette caspase permet le clivage du pro-IL-1 β et du pro-IL-18, libérant leurs formes actives : l'IL-1 β et IL-18.

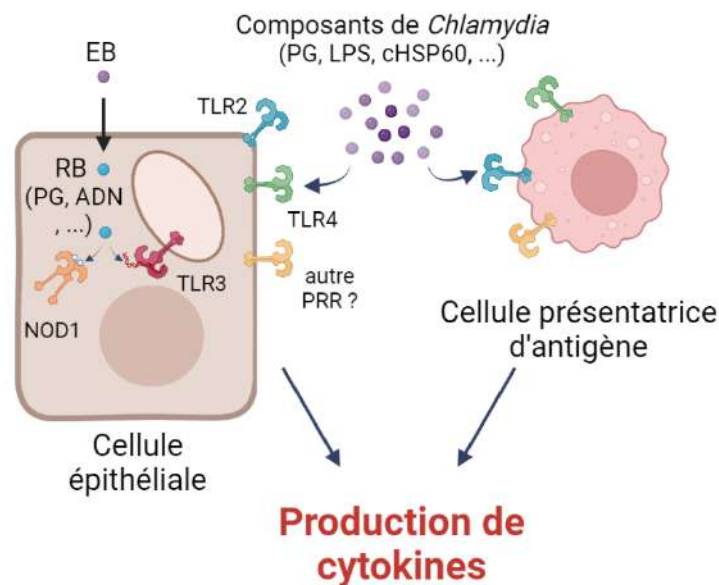


Figure 19 : Rôle des différents PRR impliqués dans la reconnaissance de CT. Plusieurs composants de *Chlamydia* peuvent activer les PRR à la surface ou au sein des cellules épithéliales ou présentatrices d'antigène. L'activation du PRR déclenche une voie de signalisation permettant l'activation de NF- κ B et la production de cytokines et chimiokines. PG, peptidoglycane ; LPS, lipopolysaccharide ; cHSP60, protéine de choc thermique de *Chlamydia* 60 kDa. Créée sur Biorender.com.

Par ailleurs, le TLR3 semble important au niveau des cellules épithéliales pour la production de cytokines suite à l'infection CT, puisque dans un modèle de cellules épithéliales déficient en TLR3 (hOE), l'induction de cytokines est diminuée par rapport aux cellules sauvage³⁵⁴. *In vivo*, cette induction de l'inflammation est également retrouvée au niveau des fluides vaginaux de femmes infectées par CT, par rapport à des femmes non infectées, avec une augmentation de cytokines impliquées dans les réponses humorales, la production d'IFN de type I et dans la polarisation Th17 (entre autres IL-1 β , TNF α , IL-8, VEGF, G-CSF, IL-10, IL-12, et IL-6)^{355,356}. Chez les femmes qui souffrent d'une infection du tractus génital haut, ou chez les femmes symptomatiques, une plus forte expression de certaines cytokines (entre autres CXCL10, TNF α , IL-17A, IL-8, IL-10, G-CSF) est retrouvée dans les fluides cervicovaginaux^{357,358}. L'expression de la majorité de ces cytokines est positivement associée à la charge bactérienne au niveau cervical³⁵⁷. D'autres études montrent que l'IFN γ joue un rôle lors de l'infection *Chlamydia in vivo*, chez la femme³⁵⁹, mais également dans un modèle de souris³⁶⁰ : l'infection de DC par *C. psittaci* permet le relargage d'exosomes capables d'interagir avec les cellules NK et d'induire la production d'IFN γ . Plusieurs autres modèles *in vitro* montrent

que l'exposition à l'IFN γ de cellules épithéliales infectées par CT entraîne des altérations au niveau du cycle de réplication de CT³⁶¹⁻³⁶³.

Cette production de cytokines pro-inflammatoires entraîne le recrutement de neutrophiles, de cellules NK, de DC et de monocytes (Figure 20B)³³³. La production d'IL-1 α et d'IL-8 en particulier est associée au recrutement précoce de neutrophiles. De nombreuses études font un lien entre la présence de ces neutrophiles et des lésions tissulaires induites par l'infection CT. Dans un modèle *ex vivo*, l'addition d'IL-1RA avant l'infection par CT d'explants humains des trompes de Fallope entraîne une réduction de l'expression d'IL-1 α et d'IL-8, et une réduction des dommages tissulaires observés³⁶⁴. Chez des souris IL-1 $\alpha^{-/-}$ infectées par *C. muridarum*, si la charge bactérienne est comparable aux souris sauvages, les souris IL-1 $\alpha^{-/-}$ présentent une diminution de l'expression de diverses cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , G-CSF, IL-6, CCL4, CXCL1, IL-17A, IFN γ , IL-12p70). L'infiltration des neutrophiles au niveau du tractus génital haut est également réduite et les souris IL-1 $\alpha^{-/-}$ sont protégées de dommages au niveau des trompes, contrairement aux souris sauvages³⁶⁵. La présence d'un facteur de virulence au niveau du plasmide porté par CT pourrait être nécessaire à l'activation des neutrophiles et donc au développement de la pathologie³⁶⁶. De même, chez des souris infectées par CT, la déplétion de neutrophiles, par l'ajout d'anticorps anti-Gr1 ou anti-Ly6G, entraîne une diminution du score pathologique associé à l'infection, par rapport aux souris non traitées, pour lesquelles un fort recrutement de neutrophiles, de monocytes et dans une moindre mesure de macrophages, de cellules NK et de DC est observé³⁶⁷. Dans d'autres modèles de souris pour lesquels la fonction des neutrophiles est altérée (déficience en CXCR2, nécessaire au recrutement des neutrophiles au niveau du tissu ; en MMP9, une métalloprotéase impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'induction de l'inflammation ; ou en phagocyte oxydase, majoritairement produite par les neutrophiles), la sévérité de la maladie est réduite par rapport aux souris sauvages³⁶⁸⁻³⁷⁰. Une autre étude montre que CRAMP, notamment produit par les neutrophiles, est important pour établir une infection CT persistante et la pathologie qui résulte de l'inflammation chronique³⁷¹. Les neutrophiles ne semblent donc pas impliqués dans l'élimination de CT puisque la charge bactérienne n'est pas impactée par la déplétion des neutrophiles³⁶⁷. Une étude *in vitro* a montré que CT pouvait paralyser les neutrophiles, un mécanisme médié par le *Chlamydia*

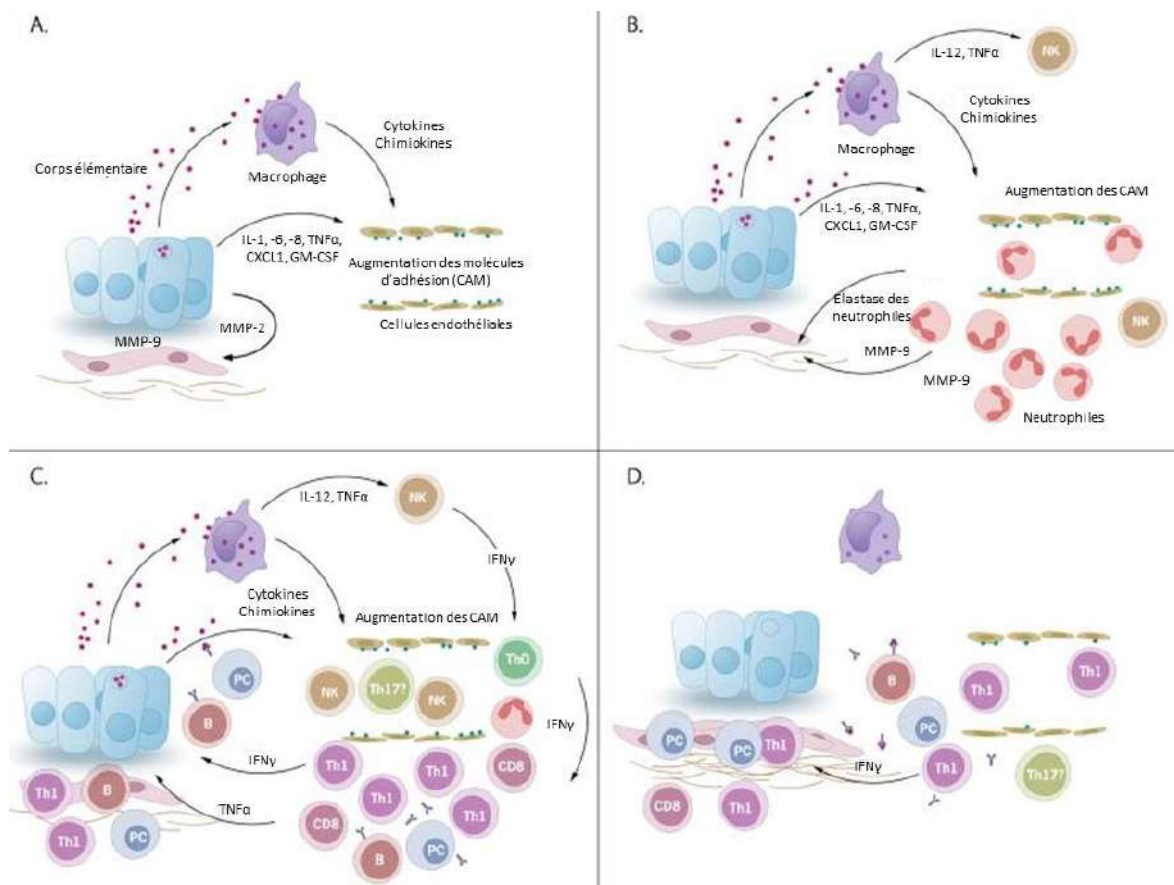


Figure 20 : Pathogenèse de l'infection par *C. trachomatis*. L'infection des cellules épithéliales et des cellules immunitaires innées par CT entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces dernières conduisent au recrutement et à l'activation de cellules immunitaires innées et dans un second temps, adaptatives favorisant la résolution de l'infection. Ces réponses peuvent induire des lésions tissulaires des voies génitales. (A) L'infection de la muqueuse entraîne la production d'IL-1, TNF α , IL-8, CXCL1, GM-CSF et IL-6, qui induisent une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales et favorisent le recrutement des cellules immunitaires. Les cellules épithéliales infectées libèrent des métalloprotéases matricielles (MMP) qui contribuent à la protéolyse et au remodelage tissulaire. (B) Les neutrophiles, les cellules NK et les monocytes sont rapidement recrutés au site infecté. Les neutrophiles libèrent des MMP et de l'élastase, contribuant ainsi aux lésions tissulaires. (C) La production d'IFN γ par les cellules NK polarise les lymphocytes T CD4 $^{+}$ vers un phénotype Th1 (producteur d'IFN γ). D'autres cellules CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$, B et des plasmocytes infiltrer les tissus infectés. Les anticorps libérés par les plasmocytes inactivent les EB et la production d'IFN γ par les lymphocytes T inhibe la réplication intracellulaire de CT. (D) Une fois l'infection résolue, l'inflammation diminue, mais des cicatrices chroniques peuvent persister. Modifiée à partir de Darville et al, 2010³³³.

protéase-like activating factor (CPAF), qui en se liant au récepteur formyl peptide 2 (FPR2) à la surface des neutrophiles, inhibe la production de ROS et de NET, favorisant la survie du pathogène³⁷². CPAF est une protéase à sérine et des recherches sont actuellement menées

dans le but de proposer des inhibiteurs dans le cadre de la prise en charge des infections graves à CT³⁷³. Pour autant, les neutrophiles pourraient jouer un rôle dans la protection contre la réinfection par CT. En effet, dans un modèle de souris réinfectées par *C. muridarum* et ayant reçu des anticorps issus de sérum de souris en rémission de l'infection CT, les neutrophiles jouent un rôle central dans l'élimination des pathogènes médiée par les anticorps³⁷⁴. Cependant dans ce modèle, aucune information n'est donnée quant à l'évolution de la pathologie. L'inflammation au niveau du site de l'infection entraîne également le recrutement et l'activation de macrophages, de DC et de cellules NK (Figure 20)³⁷⁵. CT est capable d'infecter et de persister au sein des cellules présentatrices d'antigènes sous une forme métaboliquement active mais non répliquative³⁷⁶. Au sein des macrophages, si l'élimination intracellulaire échoue, les macrophages peuvent être utilisés comme chevaux de Troie et favoriser la dissémination de CT dans les ganglions lymphatiques drainants³⁷⁷. Les cellules dendritiques peuvent également transporter les antigènes de CT apprêtés vers les ganglions drainants, où ils seront présentés à des lymphocytes T naïfs³⁷⁸. Après internalisation des EB par les APC, CT peut être reconnue par des PRR et entraîner la production de différentes cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α , IL-6, IL-12, TNF α , CXCL10, IFN γ ou GM-CSF³²⁵. La réponse immunitaire innée à l'infection par CT est impactée par le cycle menstruel³⁷⁹. Chez des femmes infectées par CT, Agrawal et al ont montré une corrélation négative entre la concentration d'œstradiol et celle d'IL-10, IL-1 β et IL-6, suggérant ainsi que l'infection par CT au niveau du TRF est régulée par l'action synergique des cytokines et des hormones sexuelles³⁸⁰.

L'activation de cette réponse immunitaire innée contribue à la préparation d'une réponse immunitaire adaptative permettant la résolution de l'infection.

4.3.2 Réponse adaptative

À un stade plus tardif de l'infection, différents lymphocytes (T, B et NK) infiltrent le site inflammatoire (Figure 20C-D)³³³. Les cellules NK produisent des cytokines (notamment IL-12 et IFN γ) qui orientent les lymphocytes T CD4⁺ vers un phénotype Th1, producteur d'IFN γ ³⁸¹, dont l'action inhibe la réplication de CT³⁶¹. L'immunité protectrice contre CT est caractérisée par la présence de ces lymphocytes T CD4⁺ sécréteurs d'IFN γ . L'IL-12 et l'IL-18

sont des inducteurs forts de la production d'IFN γ , ils peuvent agir de manière synergique au niveau des lymphocytes T CD4⁺ et des cellules NK³⁸². L'IFN γ induit l'expression de l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO), une enzyme catabolique qui diminue la concentration intracellulaire de tryptophane au sein des cellules infectées, conduisant à une persistance de CT sous une forme aberrante au sein de l'inclusion^{352,383}. Chez les femmes infectées de manière répétée par CT et chez les femmes qui sont guéries de l'infection suite à un traitement antibiotique, une forte concentration de TGF β 1 au niveau des fluides vaginaux a été associée à une forte expression de IDO comparé à des femmes non infectées ou en primo-infection CT³⁸⁴. Les auteurs suggèrent que la balance IDO1/TGF β 1 est impliquée dans le contrôle de la réponse immunitaire chez des individus exposés de manière répétée à CT. Par ailleurs, une étude montre qu'au cours de l'infection CT, la présence de lymphocytes T non-spécifiques au niveau du TRF, en particulier de type Th17 et de lymphocytes Treg pourraient contribuer à la pathologie³⁸⁵. Le rôle des lymphocytes T dans la pathologie semble confirmé par une autre étude chez la souris, dans laquelle un blocage de CXCR3 (récepteur impliqué dans l'adressage des lymphocytes T au niveau du TRF) entraîne une moindre sévérité de la pathologie à la suite d'une infection CT³⁶⁷. De même, toujours chez la souris, la déplétion de Treg CD4⁺ producteurs d'IL-10 réduit l'inflammation, une diminution des lymphocytes T Th17, le recrutement de neutrophiles et la pathologie associée à l'infection CT³⁸⁵. En particulier, le rôle potentiellement délétère des lymphocytes T Th17 est illustré par différentes études de vaccins anti-CT chez la souris³⁸⁶ : l'immunisation intranasale d'EB de *C. muridarum* induit une réponse des lymphocytes T Th1 CD4⁺ producteurs d'IFN γ et un faible taux d'IL-17. Au contraire, l'immunisation par voie intramusculaire induit des réponses Th17/Th2 associées à une forte pathologie du tractus génital supérieur. Le mécanisme sous-jacent pourrait être associé à la production d'IL-17 par ces cellules, favorisant le recrutement des neutrophiles sur le site de l'infection, qui pourraient alors induire des lésions tissulaires³⁸⁷. A l'inverse, une autre étude montre une augmentation de l'IL-17 chez les souris immunisées, associée à une protection contre l'infection³⁸⁸. Cependant, dans ce dernier modèle, la pathologie CT chronique impliquait également une augmentation de l'IL-17. Les lymphocytes T CD8⁺ ne semblent pas être impliqués dans l'immunité protectrice mais pourraient être liés à la pathogenèse en

impliquant la production de TNF α ³²⁵. En effet, dans un modèle de souris immunisées avec un vaccin basé sur la protéine de CT *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP) et déplétée en lymphocytes T CD8⁺, les auteurs n'ont pas observé de différence en termes d'évolution de la charge bactérienne entre le groupe déplété ou non³⁸⁹.

Au cours de la réponse immunitaire, les lymphocytes B participent au contrôle de l'infection CT. D'une part, ils favorisent le priming des lymphocytes T CD4⁺ lors de l'infection CT : dans des modèles de souris immunisées contre la protéine MOMP de CT, la production de TNF α et d'IFN γ est associée à la protection contre l'infection CT chez les animaux vaccinés et la déplétion de lymphocytes B réduit la protection associée à l'immunisation³⁸⁹. Par ailleurs, les plasmocytes libèrent des anticorps qui inactivent les EB extracellulaires³⁹⁰. Le rôle protecteur de ces anticorps n'est cependant pas clairement établi. Au cours de l'infection CT, les femmes développent au niveau sanguin des anticorps IgG spécifiques dirigés contre la protéine MOMP de CT³⁹¹. Ces anticorps persistent de 3 à 10 ans après l'infection CT. Des IgG et des IgA dirigés contre les antigènes MOMP sont également retrouvés au niveau des fluides cervicaux³⁹². Chez les femmes souffrant d'infections CT répétées, des IgG et des IgA dirigés contre les protéines *Heat Shock Protein* (HSP) 10 et HSP60 de CT sont également retrouvés³⁹². Un taux élevé d'anticorps dirigé contre HSP60 est un marqueur diagnostic d'infection CT persistante³⁹³. Cependant, chez les femmes séropositives à CT, il n'y a pas d'association entre le taux d'anticorps et le risque d'être réinfecté ou de développer une infection au niveau du tractus génital haut^{391,394}. Au contraire, chez les femmes réinfectées, les complexes antigènes-anticorps (anti-HSP60) pourraient même empirer le développement de la pathologie³⁹³. Une étude a montré que chez les femmes souffrant de dommages au niveau des trompes de Fallope induits par l'infection CT, le taux d'anticorps au niveau sanguin est positivement corrélé à la sévérité des dommages³⁹⁵. Cependant d'autres études montrent que le taux d'anticorps est associé de manière négative à la charge bactérienne au niveau du col mais pas au niveau de l'utérus³⁹⁴. Une autre étude montre que dans une cohorte de travailleuses du sexe au Kenya, le taux d'anticorps spécifiques de CT dans le sang et au niveau des fluides vaginaux n'est pas associé au risque d'infection CT³⁹⁶. Une fois l'infection résolue, l'inflammation diminue, mais le tissu cicatrisé peut garder des traces de l'infection.

4.3.3 Impact du microbiote sur l'infection CT et inversement

Impact du microbiote sur l'infection CT

De nombreuses études de cohortes montrent une association entre une dysbiose du microbiote vaginal et un risque accru d'acquisition d'IST et en particulier pour CT³⁹⁷⁻⁴⁰⁰. Plus précisément, différentes études montrent que les femmes possédant un microbiote vaginal de types IV ou présentant une BV sont plus susceptibles d'acquérir *N. gonorrhoeae*, CT ou encore le VIH-1 comparées aux femmes ayant un microbiote vaginal dominé par des lactobacilles⁴⁰¹⁻⁴⁰³. Les microbiotes vaginaux de type I (dominés par *L. crispatus*) confèreraient la meilleure protection contre les IST, et en particulier contre CT (Figure 21)^{397,398,404}. Une étude récente montre que différentes espèces de lactobacilles inhibent l'infection CT *in vitro* et *in vivo*, et une souche de *L. crispatus* présente le meilleur potentiel inhibiteur⁴⁰⁵. *In vitro*, différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la protection liée aux espèces de lactobacilles : elles produisent de l'acide lactique ou de l'H₂O₂, qui pourrait permettre d'inactiver différents agents causant des IST, et notamment CT^{404,406-409}. Pour l'infection par CT, d'autres auteurs proposent que la protection soit médiée par différents mécanismes de compétition avec la bactérie pathogène⁴¹⁰. D'autres études proposent que les lactobacilles inhibent l'infection CT via un remodelage de l'expression des récepteurs de CT à la surface des cellules épithéliales⁴¹¹.

Le microbiote vaginal a de manière plus générale un effet indirect sur l'acquisition d'IST puisque chez les femmes qui possèdent un microbiote vaginal en dysbiose, une forte inflammation est retrouvée. Dans le cas de l'infection par le VIH-1, l'inflammation est associée à un recrutement de cellules cibles du VIH-1, et une production de cytokines pro-inflammatoires pouvant favoriser l'infection⁴¹². Différentes études utilisant des probiotiques ont montré que les lactobacilles pouvaient permettre de réduire l'inflammation au niveau du TRF, et pourraient être utilisés pour réduire la susceptibilité aux IST⁴¹³.

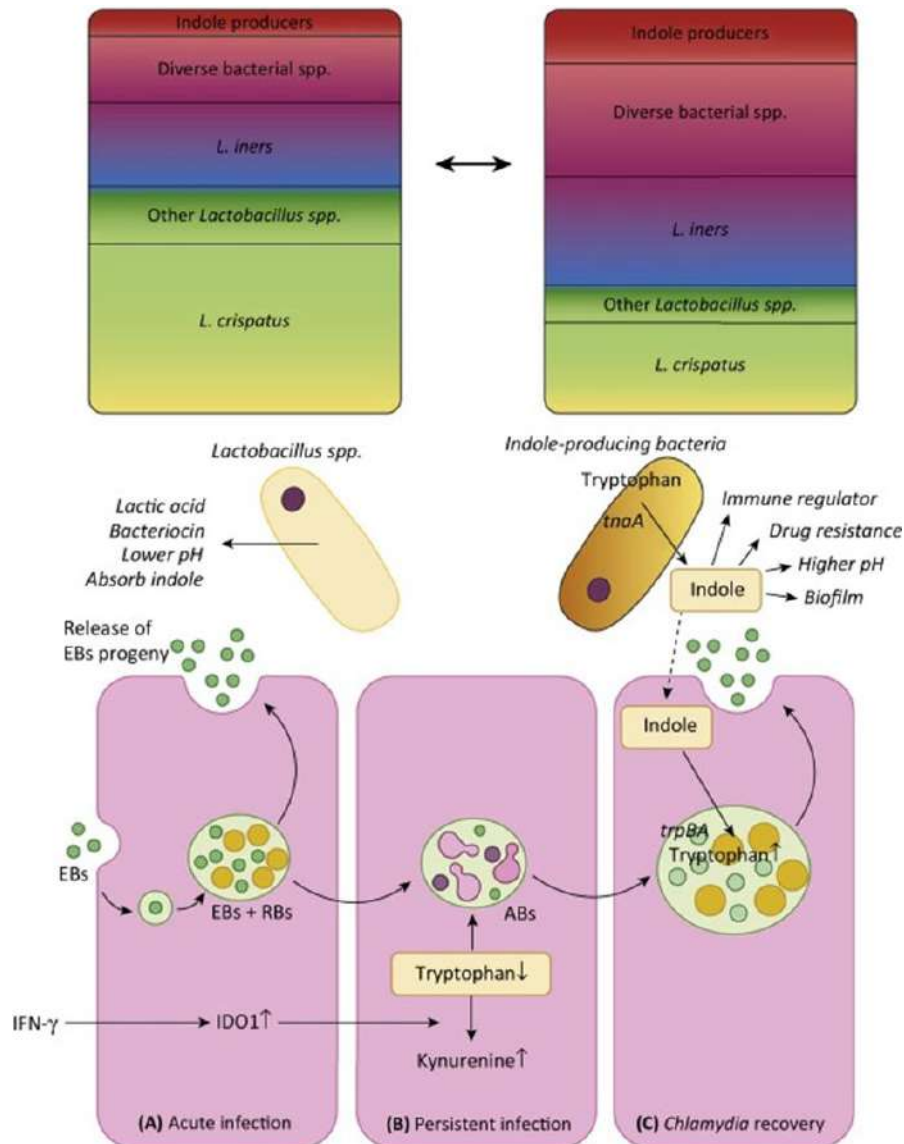


Figure 21 : Interactions entre *C. trachomatis*, le microbiote vaginal et le système immunitaire.

(A) L'infection par CT entraîne une réponse immunitaire précoce, médiée par la production d'IFN γ .
 (B) L'appauvrissement en tryptophane médié par l'IFN γ entraîne la persistance de CT. La persistance de CT est associée à une inflammation chronique et un microbiote vaginal pauvre en lactobacilles.
 (C) Les bactéries du microbiote vaginal produisent de l'indole, qui peut être reconverti en tryptophane par CT et permettre la reprise du cycle de réplication de la bactérie, menant à la libération de nouveaux EB. Extraite de Ziklo et al, 2016⁴⁰².

Impact de l'infection CT sur le microbiote vaginal

Inversement, l'impact d'une IST bactérienne sur le microbiote vaginal a été évalué, mais dans la plupart de ces études, les femmes ont reçu un traitement antibiotique contre l'infection bactérienne, ce qui complique l'interprétation de la modification du microbiote vaginal : il pourrait s'agir d'un effet de l'IST et/ou du traitement antibiotique. Dans les études

épidémiologiques, il est par ailleurs difficile de savoir si l'effet observé sur le microbiote vaginal provient d'une modification induite par la présence de l'IST ou si à l'inverse une modification du microbiote vaginal antérieure est à l'origine d'une augmentation de la susceptibilité à l'IST. Des études *in vitro* montrent qu'au cours de l'infection CT, l'activation de l'enzyme IDO1 (induite par une production d'IFN γ) entraîne la dégradation du tryptophane en kynurénine³⁸³. *In vivo*, un ratio kynurénine/tryptophane élevé est corrélé à une forte abondance de bactéries de genre *Streptococcus* ou *Peptoniphilus*, des bactéries retrouvées dans les microbiotes favorisant l'acquisition d'IST (Figure 21)⁴¹⁴. De manière similaire, *in vivo*, après traitement à l'azithromycine visant à éliminer une infection CT, une étude montre que la modification du microbiote vaginal tend à favoriser la présence de *L. iners* dans le microbiote vaginal et accroît la susceptibilité à une réinfection CT⁴¹⁵. Une étude récente chez la souris montre que le microbiote vaginal évolue suite à une infection par *C. muridarum*, et que le timing de l'infection a un impact sur la dynamique de l'évolution du microbiote vaginal⁴¹⁶.

4.3.4 Impact du LS sur l'infection CT

Comme décrit précédemment, de nombreux facteurs présents dans le LS peuvent jouer un rôle dans la susceptibilité aux IST, de manière directe ou indirecte (par exemple en modifiant l'inflammation). Cependant la plupart des études existantes portent sur la susceptibilité au VIH-1, et seules très peu de données concernent l'impact du LS lors d'une infection du TRF par CT, bien que l'acquisition de CT au niveau du TRF se fait presque toujours en présence de LS dans le cadre de transmission hétérosexuelle. Une seule étude *in vitro* montre que dans des cellules McCoy, l'infection par Chlamydia LB-1 est diminuée en présence de LS ajouté après adsorption de la bactérie. L'inhibition de CT est dose dépendante : de fortes dilutions de LS induisent une augmentation de l'infection⁴¹⁷. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour décrire les réponses immunitaires à l'infection CT au niveau du TRF dans des conditions physiologiques, en présence de LS.

4.4 Une IST fréquente en co-infection

4.4.1 Epidémiologie

CT, comme la majorité des IST, peut induire une infection à long terme et une inflammation chronique locale. Elle conduit à une susceptibilité accrue à d'autres IST, telles que l'infection par le VIH-1⁴¹⁸. De nombreuses études de cohortes ont montré que des personnes possédant une infection génitale sont plus à risque d'acquérir de nouveau une IST⁴¹⁹. En 2020, plus de 1,5 millions de personnes étaient nouvellement contaminées par le VIH-1, 38 millions de personnes vivaient avec le virus, et 680 000 personnes étaient mortes des suites du virus⁴²⁰. En 2017, la région africaine était la plus touchée, avec près de 2/3 des nouvelles contaminations et 25,7 millions de personnes vivant avec le VIH-1. Dans cette région, 6 nouvelles contaminations sur 7 sont détectées chez les femmes âgées de 15 à 19 ans. De plus, ces jeunes femmes sont deux fois plus susceptibles de vivre avec le VIH-1 que les hommes⁴²¹. Par ailleurs, chaque semaine, environ 7 000 jeunes femmes âgées de 15 à 24 ans sont infectées par le VIH-1 dans le monde. Depuis 15 ans, le nombre de morts dus au SIDA a diminué de moitié, mais l'incidence des infections ne diminue pas, et cela malgré la présence d'un traitement efficace (trithérapie). Ceci est probablement dû à un défaut de prise en charge de populations à risque : 15,2 millions de personnes infectées ne reçoivent pas de traitement antiviral, dont 10,4 millions en Afrique^{420,421}. Il est donc important d'innover en termes de stratégies de prévention, car elles limitent l'incidence des infections et les coûts liés aux traitements. Le Tableau 3 récapitule les principales stratégies de prévention du VIH-1 existant chez les femmes à ce jour.

CT est l'IST majoritaire en co-infection avec le VIH-1, avec une prévalence variable en fonction des populations, mais qui peut atteindre plusieurs dizaines de % chez certaines populations clés étudiées⁴²²⁻⁴²⁴. Une étude portant sur 609 travailleuses du sexe en Côte d'Ivoire, séropositives pour le VIH-1, a montré que l'excrétion cervico-vaginale du VIH-1 était significativement associée au CT⁴²⁵. Plusieurs méta-analyses montrent également qu'une infection CT augmente le risque d'acquisition du VIH-1^{418,426}. Dans l'étude MIRA, 4 948 femmes séronégatives pour le VIH-1 ont été recrutées et suivies pendant 12 à 24 mois. Les auteurs ont observé que les femmes infectées par CT, HSV-2, *N. gonorrhoeae* ou

Tableau 3 : Principales stratégies de prévention du VIH-1 existant à ce jour chez les femmes.

Stratégies de prévention	Exemple	Commentaires
Préservatifs	Préservatifs externes ou « masculins », préservatifs internes ou « féminins »	Les préservatifs aident à prévenir d'autres IST
Prophylaxie pré-exposition (PrEP)	Truvada® (ou équivalent générique) : un comprimé (voie orale) / jour Apretude® : une injection / 2 mois	Réduit les risques d'acquisition du VIH-1 de 99%
PrEP à la demande	2 comprimés, 24h et 2 h avant le rapport sexuel à protéger puis 2 comprimés, 24h et 48h après la première prise	
Prophylaxie post-exposition (PEP)	Trithérapie de 28 jours : Ténofovir (TDF) + Emtricitibine (FTC) + Raltégravir x2 (RAL) ou Dolutégravir (DTG) / jour	La PEP est indiquée dans les situations d'urgence : elle doit être initiée dans les 72h suivant une éventuelle exposition au VIH-1
Diagnostiques réguliers et traitement des autres IST	Recommandation du CDC : - Un dépistage VIH-1 à partir de 13 ans. - Personnes avec facteurs de risque : un dépistage VIH-1 / an	Etre infecté par d'autres IST augmente les risques de contracter ou de transmettre le VIH-1
Pratiques sexuelles à risque faible ou nul de transmission	Sexe oral	Le VIH-1 n'est pas transmis par sexe oral
Traitement des personnes vivant avec le VIH	Trithérapie antirétrovirale (ART)	Les personnes vivant avec le VIH-1 et ayant une charge virale indétectable (<200 copies du VIH/mL de sang) ne transmettent pas le virus


T. vaginalis présentaient un risque accru d'acquérir le VIH-1 par rapport aux femmes n'ayant pas contracté d'IST⁴²⁷. Ces études épidémiologiques confirment que l'infection à CT augmente le risque de contracter le VIH-1.

4.4.2 Mécanismes impliqués dans la co-infection CT/VIH-1

Les mécanismes impliqués dans la co-infection CT/VIH-1 ont été étudié *in vitro*. Ces mécanismes favorisent l'entrée ou la réplication du VIH-1. Le VIH-1 est un virus enveloppé à deux copies d'ARN simple brin de polarité positive appartenant à la famille des *Retroviridae*⁴²⁸. Au cours d'une infection, le virus se lie à la surface des cellules cibles, le plus fréquemment via le récepteur (CD4) et un corécepteur (principalement CCR5 ou CXCR4), mais il existe d'autres mécanismes d'entrée, impliquant par exemple des récepteurs alternatifs⁴²⁹. Le virus entre ensuite dans la cellule cible, puis, si la cellule est permissive, il opère une transcription inverse. L'ADN viral s'intègre dans le noyau, et de nouvelles particules virales sont produites et bourgeonnent à la surface de la cellule. Les infections par le VIH-1 se produisent principalement (40% de transmissions) via les surfaces des muqueuses du TRF lors d'une transmission par voie sexuelle^{430,431}. Au niveau du TRF, le VIH-1 présent sous forme de virus libre ou de cellules infectées, doit franchir la barrière

épithéliale avant de pouvoir infecter les cellules immunitaires susceptibles au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse⁴³². Ce passage du virus peut avoir lieu à travers des abrasions de la barrière épithéliale (induite lors de rapports sexuels ou par une inflammation), par transcytose du virus à travers les cellules épithéliales, ou par capture directe du virus par des lymphocytes T CD4⁺, DC ou macrophages qui pénètrent au niveau de l'épithélium^{433,434}. Le virus peut alors se multiplier localement (macrophages, lymphocytes), produisant ainsi une population fondatrice de virus libre ou associé à une cellule infectée⁴²⁹. Le virus peut aussi utiliser des cellules (cellules dendritiques) comme réservoir, permettant l'infection en trans de cellules, à distance du site d'entrée, facilitant ainsi la dissémination du virus. Les cytokines et chimiokines présentes dans l'environnement local peuvent avoir un impact à l'étape de l'entrée virale ou à des étapes plus tardives du cycle (Tableau 4)⁴³⁵.

Tableau 4 : Effet de différentes cytokines sur l'infection VIH-1. Le rôle et le mode d'action des principales cytokines influençant la réplication du VIH-1 (dans le cas d'un tropisme R5) sont listés de manière non exhaustive. Les effets favorisant le cycle viral sont représentés en rouge, ceux inhibant le cycle viral sont représentés en vert.

Cytokine	Mode d'action	Effet sur l'infection VIH-1
IL-8, GM-CSF	Rôle controversé, résultats dépendants des types cellulaires utilisés	+/-
CXCL10	Activation des lymphocytes T (LT), différenciation Th17, diminution des fonctions des LT et cellules NK	Favorise l'infection et réplication
IL-1 β	Nombreux effets via l'activation de NF- κ B (activation et différenciation des LT, fièvre, ...)	Favorise l'infection et réplication
IL-6	Différenciation, activation et survie des LT (activation NF- κ B en synergie avec TNF- α), ...	Favorise l'infection et réplication
TNF- α	Nombreux effets via l'activation de NF- κ B	Favorise l'infection et réplication
CCL3/4/5	Ligand de CCR5	 cellules cibles, inhibe l'entrée virale
IL-1RA	Antagoniste du récepteur à l'IL-1	Inhibe l'infection et la réplication
IL-10	Nombreux effets via l'inactivation de NF- κ B (bloque l'activation et différenciation des LT, ...)	Inhibe l'infection et la réplication
IFN- $\alpha/\beta/\gamma$	Action antivirale par ISG (PKR, OAS, ADAR, Mx1...)	Inhibent la réplication

Par exemple, les IFN jouent un rôle clé dans l'immunité anti-VIH-1 par la production d'ISG. *In vitro*, de nombreuses cytokines (IL-6, IL-12, IL-15, TNF α) augmentent la réplication du VIH-1. D'autres cytokines (IL-10, TGF β) ont un rôle débattu, pouvant augmenter ou diminuer la réplication du VIH-1 selon les conditions expérimentales. L'IL-4 régule par exemple l'expression des corécepteurs CXCR4 et CCR5, respectivement en induisant ou en inhibant leur expression à la surface des lymphocytes T. Enfin, certaines chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5) ont une activité anti-VIH-1 : en se fixant sur CCR5, elles sont directement en compétition avec les ligands viraux et bloquent l'entrée du virus. De manière générale, les femmes qui présentent une forte inflammation génitale sont plus susceptibles à l'infection par le VIH-1 que les femmes possédant un environnement génital peu inflammatoire^{412,436}. Plusieurs études *in vitro* ont cherché à expliquer la susceptibilité accrue au VIH-1 lors d'une infection CT (Figure 22) :

- L'infection chronique CT pourrait entraîner une inflammation chronique à l'origine d'une production de cytokines pro-inflammatoires au niveau local, induisant le recrutement de macrophages, DC ou lymphocytes T CD4⁺, cibles du VIH-1⁴¹².
- L'infection CT induirait des dommages tissulaires au niveau de la barrière épithéliale, facilitant le passage du virus à travers ces brèches⁴³⁷.
- L'infection par CT des cellules épithéliales pourrait faciliter l'attachement du virion à la surface des cellules infectées et ainsi induire la transcytose du virus à travers la barrière épithéliale⁴³⁸.
- L'infection par CT pourrait favoriser au niveau local, l'augmentation de l'expression des corécepteurs du VIH-1 sur les cellules cibles. Elle pourrait également favoriser la réplication du VIH-1 au sein des lymphocytes T CD4⁺⁴³⁹.

Cependant, ces études ont été réalisées *in vitro* et des études *in vivo* sont nécessaires pour confirmer ou infirmer les mécanismes décrits précédemment.

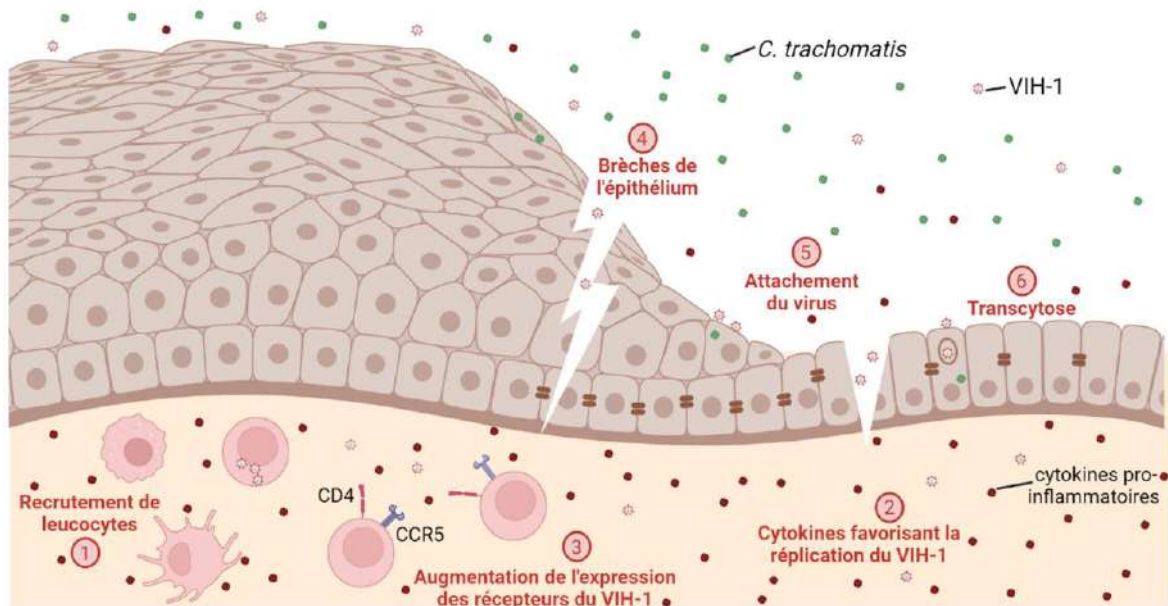


Figure 22 : Mécanismes potentiels impliqués dans la co-infection *C. trachomatis*/VIH-1.

L'infection par CT entraîne une inflammation chronique, à l'origine du recrutement de cellules cibles du VIH-1 au niveau des muqueuses du TRF (1), et d'un environnement cytokinique favorisant la réplication du VIH-1 (2). Les cellules recrutées présenteraient également une augmentation des récepteurs impliqués dans l'entrée du VIH-1 (3). L'infection CT est à l'origine de lésions tissulaires qui pourraient favoriser le passage du virus à travers la barrière épithéliale (4). Pour finir, l'infection par CT favorisait l'attachement du VIH-1 à la surface des cellules épithéliales infectées (5), et ces dernières pourraient également faciliter le passage du virus à travers la barrière épithéliale par un mécanisme de transcytose (6). Créée sur Biorender.com.

L'inflammation joue donc un double rôle d'une part dans la pathogenèse et d'autre part pour l'élimination de CT. Certains facteurs de l'inflammation peuvent contribuer à la pathologie (IL-1 ou GM-CSF avec le recrutement de neutrophiles, à l'origine de dommages tissulaires), d'autres (IL-17, IL-18, ...) pourraient favoriser l'élimination de CT. C'est la balance entre ces différents facteurs qui déterminent l'évolution de l'infection vers une forme symptomatique de la pathologie ou vers une rémission naturelle.

5 MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE DES MUQUEUSES DU TRF

Aucun modèle expérimental ne récapitule toutes les caractéristiques des muqueuses du TRF humain. Le but d'un modèle est de créer un système qui reflète la réalité biologique mais qui peut être perturbé et manipulé pour comprendre la physiologie et la pathologie au niveau du TRF⁴⁴⁰. En effet, la diversité des paramètres présents au niveau du TRF peut rendre l'interprétation des études cliniques complexes d'où un besoin de systèmes de modélisation sophistiqués ou simplifiés et contrôlés permettant de décortiquer les différentes étapes et d'identifier le rôle des différents paramètres (Figure 23). Une revue récente résume les méthodes actuelles ou en cours de développement visant à mieux comprendre la biologie de la reproduction au niveau du TRF⁴⁴¹.

5.1 Modèles *in vitro* et *ex vivo*

De nombreux modèles *in vitro* et *ex vivo* permettent de modéliser les muqueuses du TRF : modèles de culture cellulaire monocouche, multicouches, modèles 3D, culture sur inserts *ex vivo*, modèles microfluidiques, ... Chaque modèle présente des avantages et des inconvénients (Figure 23).

Des cellules épithéliales, primaires ou de lignées, ont été utilisées *in vitro* pour modéliser les muqueuses du TRF⁴⁴². Les cellules primaires peuvent être obtenues à partir de tissus du TRF récupérés à la suite d'interventions chirurgicales (par exemple, chez des femmes devant subir une hystérectomie). Les cellules A2EN par exemple sont issues de l'endocol humain et ont été immortalisées par transduction virale en utilisant les protéines E6/E7 du papillomavirus humain⁴⁴³. D'autres modèles cellulaires issus du vagin, de l'endocol ou de l'exocol (cellules VK2, Ect1, ou End1) ont été générés sur ce même principe⁴⁴⁴. Ces cellules nécessitent des milieux de culture spécifique, et peuvent être cultivées en conditions aérobie ou anaérobie, comme au niveau des muqueuses du TRF. Ces cellules expriment des TLR fonctionnels, ce qui permet l'étude de la réponse innée des cellules épithéliales à un stimulus externe, en termes de production de cytokines, ou de peptides anti-microbiens par exemple⁴⁴⁵. Ces modèles permettent également d'étudier la toxicité de molécules, en regardant par exemple la viabilité cellulaire après exposition à des microbicides⁴⁴⁶.

	Culture cellulaire monocouche	Culture d'inserts <i>ex vivo</i>	Modèles 3D Organoides	Modèles animaux	Modèles microfluidiques	
Modélisation des microorganismes	<p>Croissance Adhère Cytotoxicité</p> <p>Modélisation des communautés Biofilms</p> <p>Invasion du tissu</p>	<p>Croissance du microbiote natif Biofilms</p> <p>Réaction différentielle en fonction des bactéries Sensible aux contaminations</p>	<p>Croissance Adhère Biofilms</p> <p>Modélisation des communautés</p>	<p>Adhère, Biofilms Modélisation des communautés</p> <p>Microbiote natif différent de l'Homme</p>	<p>Adhère, Biofilms Microcopie vidéo en live</p> <p>Technique à moyen débit Modélisation des supports nutritifs des communautés</p>	<p>Avantages / Utilisations actuelles</p> <p>Limites / Développements nécessaires</p>
Modélisation de l'hôte	<p>Facilité d'utilisation Expansion cellulaire rapide Production de cytokines</p> <p>Modélise uniquement l'épithélium basal</p>	<p>Interface air-milieu Différenciation et exfoliation 3D Glycogène et mucus</p> <p>7-10 jours de culture Nombre de donneur limité Incorporation limitée des cellules immunitaires</p>	<p>Technique à haut débit Différenciation 3D Mucines et mucus Peptides antimicrobiens</p> <p>28 jours de culture Equipement spécialisé</p>	<p>Tissu complexe Système Immunitaire Modifications génétiques</p> <p>Limitation du nombre d'échantillons Coût élevé Différences avec l'Homme</p>	<p>Avantages / Utilisations actuelles</p> <p>Limites / Développements nécessaires</p>	<p>Avantages / Utilisations actuelles</p> <p>Limites / Développements nécessaires</p>
Modélisation de l'environnement	Etude indépendante des différents tissus du TRF					
	Environnement atmosphérique en condition physiologique ou modifiable					
	Environnement nutritif en condition physiologique ou modifiable					
	Diffusion progressive du fluide au sein de la structure					

Figure 23 : Comparaison de différents modèles expérimentaux *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Les principales forces et limites d'utilisation dans les domaines actuels de développement, ainsi que les aspects de l'environnement vaginal sont récapitulés pour différents modèles de culture de cellules humaines, de modèles de rongeurs animaux et de modèles de vaginose bactérienne sans muqueuse. Extraite de Herbst-Kralovetz et al., 2016⁴⁴⁰.

Cependant les cellules épithéliales se comportent différemment en culture lorsque d'autres cellules (stromales, ou immunitaires) sont présentes, tel que c'est le cas *in vivo*. Ce qui est observé dans le modèle de culture monocouche n'est donc qu'une partie de ce qui se passe *in vivo*. Dans des modèles multicouches, les cellules épithéliales, polarisées ou non, sont disposées sur un support membranaire poreux (la taille des pores peut varier), placées dans un puits standard d'une plaque 6, 12, 24 ou 96 puits. Ainsi, le support membranaire sépare deux espaces (compartiments apical et basolatéral). D'autres types cellulaires (cellules stromales, cellules immunitaires) peuvent ainsi être ajoutées dans le compartiment basolatéral. Ce modèle permet d'étudier de manière directionnelle les sécrétions des cellules, d'appliquer de manière sélective un composant à étudier ou encore d'étudier la capacité de migration des cellules immunitaires en réponse à un stimulus par exemple^{442,447,448}.

Une autre approche expérimentale consiste à créer des modèles 3D organotypiques humains pour différents compartiments du TRF^{442,449}. Pour se faire, des cellules épithéliales humaines sont mises en présence de billes recouvertes de collagène dans un bioréacteur, ce qui permet aux cellules de se fixer, de croître et de se différencier en agrégats comparable au tissu 3D⁴⁵⁰. Les agrégats tissulaires 3D peuvent ensuite être placés dans des plaques pour analyser leur réponse à un stimulus. Des modèles 3D ont été réalisés à partir de cellules vaginales et les agrégats obtenus présentent des caractéristiques du tissu vaginal *in vivo*, avec la présence de jonctions serrées, la sécrétion de mucus, la formation de microcrêtes, la sécrétion de médiateurs immunitaires et des réponses à des stimuli externes similaires à celles observées *in vivo*⁴⁴⁹. Un des avantages majeurs de ce type de modèle est qu'ils permettent de modéliser les propriétés structurelles et morphologiques de la barrière vaginale, qui n'est pas possible de reconstituer de manière fidèle dans les modèles 2D. Notamment en raison de caractéristiques de barrière améliorées, les modèles 3D sont plus résistants à la toxicité des microbicides et à l'infection microbienne par rapport aux monocouches 2D⁴⁴⁰. Ils présentent en revanche quelques inconvénients : d'une part le

temps de culture relativement long (28 jours) nécessaire pour la formation des agrégats. D'autre part, il n'est à ce jour pas encore possible d'incorporer des cellules immunitaires dans ce modèle, et il ne permet pas d'effectuer de tests de migration cellulaire.

Les modèles *ex vivo* offrent une opportunité unique d'étudier les mécanismes intervenant au niveau du TRF dans un cadre expérimental contrôlé où l'organisation tridimensionnelle ainsi que la diversité cellulaire du tissu sont préservées. Dans ces expériences, des biopsies du TRF peuvent être placées en culture sur des éponges de collagène à l'interface milieu de culture-air et maintenues en culture quelques semaines. Cette histoculture favorise l'accès des cellules du tissu aux nutriments dans le milieu de culture et à l'oxygène, mais la perte progressive de l'intégrité tissulaire et des architectures fonctionnelles reste la principale limitation de ces modèles. Les histocultures peuvent être mis en présence de facteurs de l'environnement du TRF, et/ou d'agents responsables d'IST, afin d'élucider le rôle de ces facteurs et/ou de modéliser les interactions hôtes/pathogènes. En effet, dans ces modèles *ex vivo*, différents marqueurs de l'infection ou de l'inflammation peuvent être dosés dans les surnageants de culture, des coupes du tissu peuvent être réalisées afin d'étudier les interactions cellulaires en microscopie et le tissu peut être digéré afin d'étudier les populations cellulaires en cytométrie^{451,452}.

D'autres modèles expérimentaux se basent sur la technologie microfluidique pour modéliser le microenvironnement cellulaire *in vivo* : des modèles récents d'organes sur puce permettent de reproduire *in vitro* les fonctions tissulaires des organes du TRF. Ces dispositifs ont permis d'évaluer des changements d'activité métabolique spécifiques et l'effet de l'exposition à un stimulus (hormone, composé chimiques, ...) sur la reproduction et la fertilité⁴⁵³. Cependant, cette technologie n'a pas encore été utilisée pour l'étude de pathologies, probablement en raison d'un certain nombre de défis techniques⁴⁵³.

5.2 Modèles *in vivo* : intérêt du macaque cynomolgus

Les modèles animaux sont utiles pour répondre à des questions fondamentales difficiles à explorer chez l'Homme (Figure 23). En effet nous avons montré que les études cliniques chez l'Homme ne permettent pas toujours d'élucider les mécanismes impliqués dans la modulation de l'inflammation, de la réponse immunitaire au niveau du TRF, ou encore de la

susceptibilité aux IST car tous les paramètres ne sont pas maîtrisés. A l'inverse, les modèles animaux présentent l'intérêt d'être des modèles contrôlés, où l'on peut maîtriser le moment de l'infection, des prélèvements, etc... Un modèle animal idéal combinerait facilité d'utilisation, traçabilité génétique et un environnement génital ressemblant étroitement à celui de l'Homme. Un tel modèle n'existe pas actuellement, mais le modèle primate non humain (PNH) comporte différents avantages, qui en font un modèle expérimental pertinent pour de nombreuses études précliniques. L'histoire évolutive des primates a conduit à l'apparition des *Cercopithecoidea* (dont le macaque), qui ont divergé par rapport aux *Hominoidea* (dont l'Homme) il y a 6-7 millions d'années⁴⁵⁴. Le modèle PNH présente plusieurs avantages de par sa proximité avec la génétique, la physiologie et le système immunitaire humain. Les PNH sont aussi sensibles à de nombreux pathogènes infectant l'espèce humaine et la pathogénèse est souvent similaire⁴⁵⁵. Le macaque cynomolgus est donc un modèle préclinique pertinent pour l'étude de la réponse aux IST, les résultats obtenus sur ce modèle sont plus facilement transposables à l'Homme comparé à d'autres modèles animaux.

5.2.1 Généralités sur l'espèce

Trois modèles de macaques sont couramment utilisés en recherche biomédicale : le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), crabier également appelé macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) et à queue de cochon (*Macaca nemestrina*)⁴⁵⁶. Les macaques cynomolgus sont originaires d'Asie du Sud-Est. Aujourd'hui, ils sont également présents à l'île Maurice, où ils auraient été amenés au 16^{ème} siècle. Au niveau de l'île Maurice la population actuelle présente donc une diversité génétique restreinte (par effet de fondation) et n'a jamais été exposée à un grand nombre de pathogènes⁴⁵⁷. Ceci en fait un modèle de choix, particulièrement utilisé en Europe pour la recherche médicale.

5.2.2 Physiologie du macaque cynomolgus

Muqueuses du TRF

La structure et les fonctions du TRF des femelles macaque cynomolgus sont similaires à celles de la femme⁴⁵⁸. La durée relative de mise en place des grandes fonctions de reproduction est aussi comparable entre les deux espèces. Par ailleurs, la localisation, la composition et le phénotype des cellules immunitaires au niveau du TRF est également

comparable chez la femme et le macaque cynomolgus³⁰¹.

Cycle menstruel

La durée moyenne du cycle menstruel chez le macaque cynomolgus (28-32 jours) est comparable à celui de la femme (28-30 jours), avec une phase folliculaire de J0 à J12-J14 et une phase sécrétoire légèrement plus longue que chez la femme. Cette durée peut cependant être très variable en fonction des femelles étudiées : la durée du cycle varie de 22 à 37 jours et des menstruations de 1 à 8 jours dans une étude regroupant 93 macaques cynomolgus femelles⁴⁵⁹. Comme chez la femme, les femelles macaques cynomolgus sont cyclées toute l'année, contrairement aux macaques rhesus qui présentent des variations saisonnières de leur cycle ovarien⁴⁶⁰.

Système immunitaire

La plupart des cellules immunitaires retrouvées au niveau sanguin chez le macaque sont comparables à celle retrouvée chez l'Homme (Figure 24). L'expression de marqueurs de surface des leucocytes sanguins est proche entre le PNH et l'Homme⁴⁶¹. Cependant, il existe quelques différences : le nombre de lymphocytes T CD4⁺ CD8⁺ et le ratio DC non classique/DC classique sont plus élevés chez le macaque cynomolgus que chez l'Homme, en revanche, le nombre de lymphocyte B, l'expression de CD11c et CD16 sur les neutrophiles ou de CD8 sur les cellules NK est plus faible au niveau sanguin chez le macaque cynomolgus par rapport à l'Homme⁴⁶¹.

Au niveau génital, les populations de cellules immunitaires retrouvées sont également comparables entre la femme et les femelles macaques cynomolgus. Les cellules immunitaires représentent entre moins de 1% et 39% des cellules vivantes au niveau du TRF macaques, alors qu'elles représentent moins de 1% à 10% des cellules vivantes au niveau du TRF humain. Au niveau sanguin, les cellules CD45⁺ représentent au moins 80% des cellules vivantes chez la femme et les femelles cynomolgus. Les lymphocytes T sont majoritaires dans tous les compartiments du TRF, et la fréquence de T CD8⁺ est plus élevée par rapport aux CD4⁺, comme celle retrouvée chez la femme³⁰¹. Les lymphocytes T ont majoritairement un phénotype mémoire au niveau des différents compartiments du TRF, alors qu'ils sont majoritairement naïfs au niveau sanguin⁴⁶².

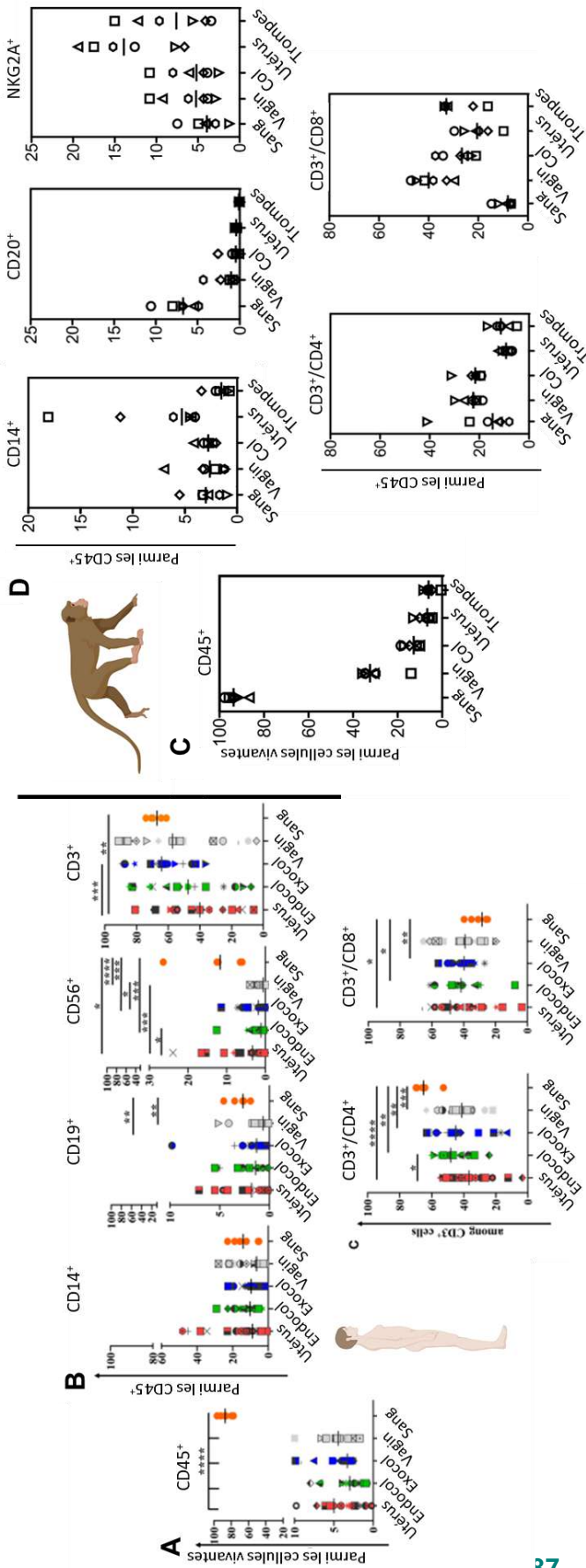


Figure 24 : Comparaison des principales populations du système immunitaire au niveau sanguin et dans le TRF, chez la femme et le macaque cynomolgus. Distribution des cellules immunitaires chez la femme (A et B) et la femelle macaque cynomolgus (C et D). Chaque symbole représente un individu. Pourcentage de cellules CD45⁺ parmi les cellules vivantes (A et C). (B) Cellules présentatrices d'antigène CD14⁺, lymphocytes B CD19⁺, cellules NK CD56⁺ et cellules T CD3⁺ parmi les cellules CD45⁺ (panel haut). Cellules T CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺CD8⁺ parmi les cellules CD45⁺ (panel bas). (D) Cellules présentatrices d'antigène CD14⁺, lymphocytes B CD20⁺ et cellules NK NKG2A⁺ parmi les cellules CD45⁺ (panel haut). Cellules T CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺CD8⁺ parmi les cellules CD45⁺ (panel bas). Modifiée à partir de Benjelloun et al., 2020 et Marlin et al., 2017^{25,462}.

La fréquence de lymphocyte B est très faible dans tous les compartiments du TRF chez la femme et la femelle macaque cynomolgus, alors qu'elle est plus élevée au niveau sanguin : de moins de 1% à 5% chez la femme et de 5 à 10% chez les femelles macaques cynomolgus. Des macrophages sont présents dans tous les compartiments du TRF, ils représentent moins de 20% des cellules immunitaires chez la femme comme chez la femelle macaque cynomolgus. Leur fréquence au niveau de l'utérus est légèrement supérieure à celle observée dans les autres compartiments. Les cellules NK sont également présentes dans tous les compartiments du TRF et leur fréquence est plus élevée dans l'utérus que dans les autres compartiments du TRF.

Microbiote vaginal

Le microbiote vaginal des femelles macaques cynomolgus est pauvre en lactobacilles, contrairement à ce qui est observé chez la femme (Figure 25). Elle présente également un pH vaginal élevé⁴⁶³. La composition du microbiote vaginal est polymicrobienne et présente une grande variabilité interindividuelle⁴⁶⁴. Les genres les plus abondants retrouvés dans le microbiote vaginal sont *Sneathia*, *Porphyromonas*, *Prevotella* et *Fusobacterium*. Les lactobacilles sont retrouvés mais à une faible abondance. Le microbiote vaginal du macaque cynomolgus est similaire au CST IVa retrouvé chez l'Homme. La composition du microbiote vaginal varie au cours du cycle menstruel, comme le montre l'association entre les niveaux de progestérone et l'abondance relative de plusieurs genres bactériens (*Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* ou encore *Fusobacterium*)⁴⁶⁴.

Liquide Séminal

La composition du LS varie entre différentes espèces de mammifères, mais ses grandes fonctions sont en revanche bien conservées au sein de cette classe d'animaux²⁵⁵. Il existe différentes stratégies de reproduction chez les mammifères notamment en fonction de l'anatomie des tissus reproducteurs, en particulier au niveau du site de dépôt de sperme et des populations de cellules répondant au LS²⁵⁵. Le LS de macaques cynomolgus est également riche en cytokines, notamment en TGF β , comme retrouvé chez l'Homme⁴⁶⁵. Le LS de macaques cynomolgus pourrait aussi entraîner une réponse immunitaire au niveau du TRF, puisqu'il induit le recrutement de DC, de lymphocytes et l'activation des

lymphocytes présents dans la *lamina propria* d'explants de colons⁴⁶⁵.

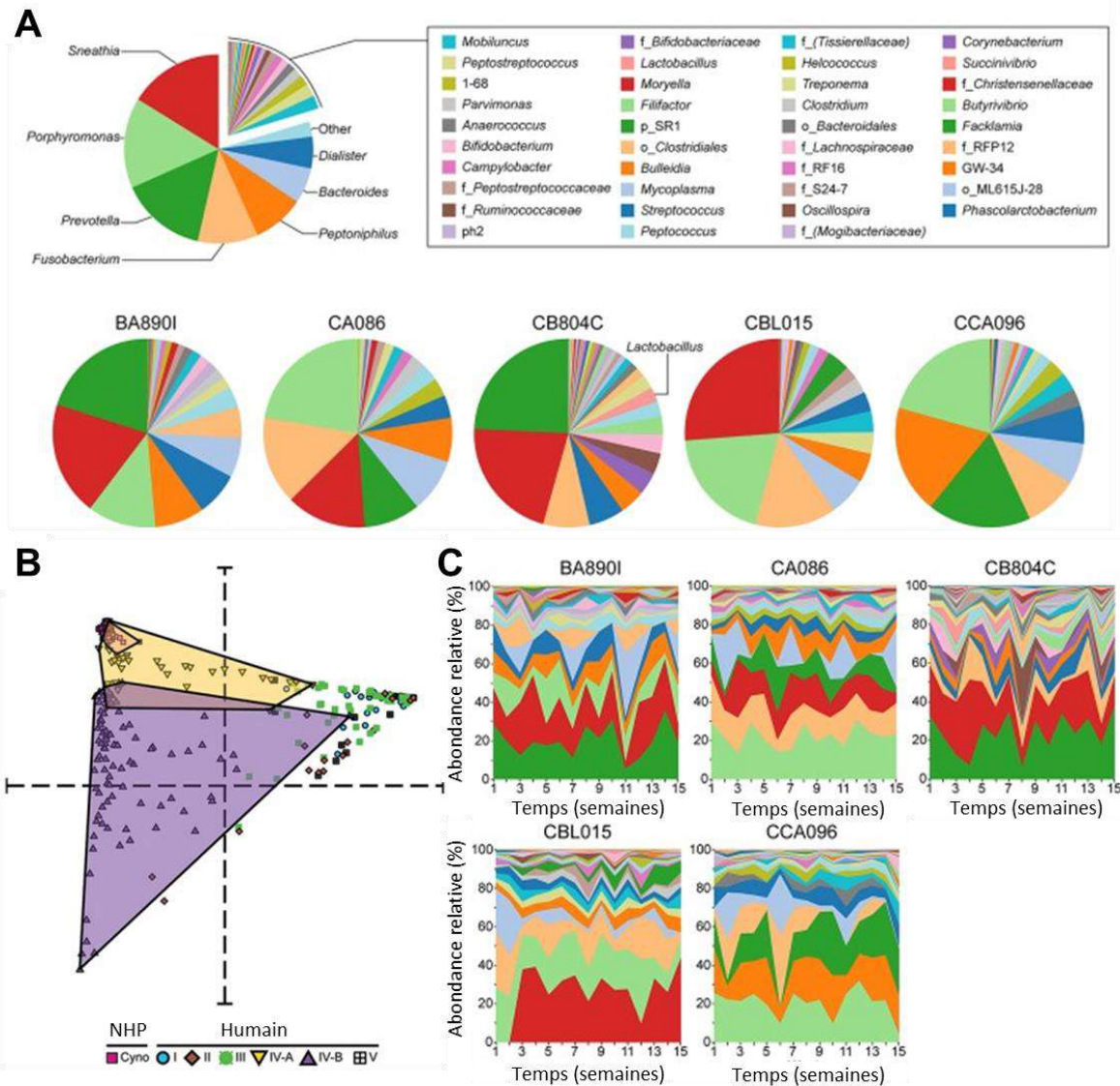


Figure 25 : Le microbiote vaginal chez les femelles macaques cynomolgus. (A) Moyenne des abondances relatives des taxons de cinq animaux pendant 15 semaines de suivi (panneau supérieur). Les moyennes des abondances relatives pour chaque animal sont également représentées (panneaux inférieurs). Pour chaque taxon, le nom du genre est indiqué, ou bien la famille (f_), l'ordre (o_), la classe (c_) ou le phylum (p_). (B) Représentation montrant les similitudes entre le microbiote vaginal du macaque (issu de Nugeyre et al, 2019) et humain (issu de Ravel et al., 2010). Les points sont colorés différemment en fonction de l'espèce et des types d'états communautaires (CST) définis chez l'Homme. Sur cette représentation, le microbiote vaginal des macaques est proche du CST IVa chez la femme. (C) Cinétique de l'abondance relative des taxons au cours des 15 semaines de suivi, pour chaque animal. Extraite de Nugeyre et al, 2019⁴⁶⁴.

5.2.3 Réponse à l'infection CT

Différentes espèces de macaques ont été utilisées pour étudier la réponse à l'infection CT⁴⁶⁶. Dans un modèle macaque rhésus, l'inoculation intravaginale répétée de 10^6 IFU de CT svD donne lieu à une infection CT non persistante⁴⁶⁷. Dans un autre modèle de macaque à queue de cochon, une simple dose intravaginale de 10^6 IFU de CT donne lieu à l'infection de 50% des animaux⁴⁶⁸. Au sein de notre laboratoire, le modèle d'infection intravaginale par CT sur le modèle macaque cynomolgus a été mis en place par Martin Siguier sous la direction de Delphine Desjardins, et a permis de montrer qu'une dose simple ou répétée de CT svD à 10^7 IFU induit l'infection non persistante de 100% des animaux inoculés (n=2). Suite à l'exposition répétée, des infiltrats mononucléaires sont retrouvés au niveau de la muqueuse vaginale à l'euthanasie (7 semaines post dernière inoculation CT) quelle que soit la dose de CT inoculée et des infiltrats de neutrophiles sont observés au niveau du col de l'utérus. Les animaux présentent une inflammation locale avec une augmentation de la concentration de différentes cytokines pro-inflammatoires dans les fluides vaginaux par rapport au niveau basal.

En conclusion générale, les nombreux facteurs de l'environnement local (bactéries du microbiote vaginal, LS, hormones, IST, ...) ont un impact au niveau des muqueuses du tractus reproducteur féminin (TRF). Ils modulent notamment l'inflammation et pourraient avoir un impact sur le risque d'acquisition d'IST. Le rôle de l'inflammation au niveau du TRF est cependant peu étudié dans le cadre de co-infections et en particulier, les phénotypes et les fonctions des neutrophiles au niveau des muqueuses. Au cours de cette introduction, nous avons montré que le microbiote vaginal a un rôle central dans la régulation de l'inflammation du TRF. En effet, un microbiote vaginal riche en lactobacilles est caractéristique d'un environnement optimal associé à une protection contre les IST. À l'inverse, une dysbiose est associée à une inflammation locale, caractérisée par une production de cytokines pro-inflammatoires, au recrutement et l'activation de cellules immunitaires, dont les neutrophiles et à un plus fort risque d'acquisition d'IST. De nombreux facteurs influencent la composition du microbiote vaginal et les bactéries du microbiote ont un impact au niveau des muqueuses du TRF via différents mécanismes (production d'acide

lactique, de biofilms, de composés anti-microbiens, capacité d'adhésion aux cellules épithéliales, ...). Les modèles animaux, tels que le primate non humain (PNH), présentent de nombreux avantages pour étudier les IST au niveau du TRF.

Dans une revue soumise à *Frontiers In Reproductive Health* dans l'édition spéciale *Inflammation in the female genital tract*, nous reprenons une partie des éléments présentés dans cette introduction (voir Annexe 1). En effet, nous exposons comment la composition du microbiote vaginal affecte l'environnement local, notamment en termes d'inflammation. Nous discutons aussi de l'interaction entre le microbiote vaginal et la susceptibilité aux IST. Enfin, nous valorisons l'intérêt du modèle PNH pour apporter des éléments d'informations nécessaires pour le développement de nouvelles thérapies contre les IST au niveau du TRF.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Hypothèses

La transmission sexuelle d'agents pathogènes de l'homme vers la femme est une des voies majoritaires d'acquisition d'IST en présence de LS. Les facteurs de l'environnement du TRF tels que les hormones sexuelles, le LS ou le microbiote vaginal, impactent la susceptibilité à différentes IST de manière directe ou indirecte, par exemple en modulant l'inflammation. Au niveau du TRF, l'inflammation est notamment médiée par des facteurs solubles (cytokines, chimiokines, peptides antimicrobiens, anticorps, ...) et des cellules immunitaires (lymphocytes, cellules dendritiques, neutrophiles, ...). Un environnement fortement inflammatoire au niveau du TRF (caractérisé par exemple par une forte concentration en cytokines proinflammatoires, un recrutement et l'activation de différentes cellules immunitaires) est associé à une susceptibilité accrue à certaines IST. L'infection par CT est l'IST bactérienne prédominante chez les jeunes femmes. Une infection préexistante est associée à une forte inflammation (avec une forte production de cytokines et un recrutement de neutrophiles) au niveau du TRF et à un risque accru de co-infections telles que le VIH-1. Il est important de mieux caractériser le rôle des facteurs de l'environnement au niveau des muqueuses du TRF, et notamment les mécanismes impliqués dans l'induction de l'inflammation, pour comprendre leur impact sur la susceptibilité aux IST.

Travaux précédents du laboratoire

Au laboratoire, plusieurs études avaient été réalisées sur cette thématique :

- Un modèle d'infection intravaginale par CT (dose simple ou répétée de CT svD à 10^7 IFU) a été mis au point sur le modèle macaque cynomolgus, permettant l'infection non persistante de 2/2 animaux (Siguier et al., non publié).
- Un modèle d'infection intravaginale par le SIV a été mis au point en présence de liquide séminal sur le modèle macaque cynomolgus⁴⁶⁹.
- Les populations de cellules immunitaires ont été caractérisées au niveau du TRF sur le modèle macaque cynomolgus après une vaccination systémique. L'étude a montré une compartimentation des cellules immunitaires, étayée par des analyses transcriptomiques⁴⁶².
- L'impact de l'exposition intravaginale de LS (issu de donneurs VIH-1⁺) sur les réponses immunitaires locales a été caractérisé dans le modèle macaque cynomolgus. Les expositions multiples au LS n'ont pas eu d'impact sur les réponses vaccinales anticorps, mais elles ont modifié les réponses lymphocytaires T vaccinales notamment au niveau du col de l'utérus³⁰¹.
- La composition du microbiote vaginal et rectal a été caractérisé de manière longitudinale pour la première fois chez cinq femelles macaque cynomolgus cyclées. La composition bactérienne rectale et vaginale est polymicrobienne, avec une plus grande variabilité inter-individuelle dans le vagin. Dans le vagin, l'abondance relative de 12 genres bactériens était associée aux niveaux de progestérone⁴⁶⁴.
- Les populations de cellules immunitaires ont été caractérisées ainsi que les profils de cytokines des différents compartiments du TRF humain (vagin, endocol, exocol et utérus) avant et après stimulation avec des agonistes de TLR. Les réponses cytokiniques variaient avec différents ligands TLR et compartiments du TRF, soutenant le rôle de ces tissus dans l'immunité antimicrobienne génitale et dans le contrôle de l'inflammation tout en permettant le maintien de leur fonction reproductrice²⁵.

Au cours de cette thèse, nous avons fait les hypothèses suivantes (Figure 26) :

- 1) L'exposition à différents facteurs de l'environnement du TRF (microbiote vaginal, LS, hormones sexuelles) modifie l'inflammation génitale (notamment au niveau des profils de cytokines et des neutrophiles) et la susceptibilité à l'infection CT.
- 2) Au cours d'une infection CT, les facteurs de l'environnement du TRF (microbiote vaginal, LS, hormones sexuelles) modifient l'inflammation induite par l'infection et ont un impact sur la susceptibilité à la co-infection par le VIH-1.

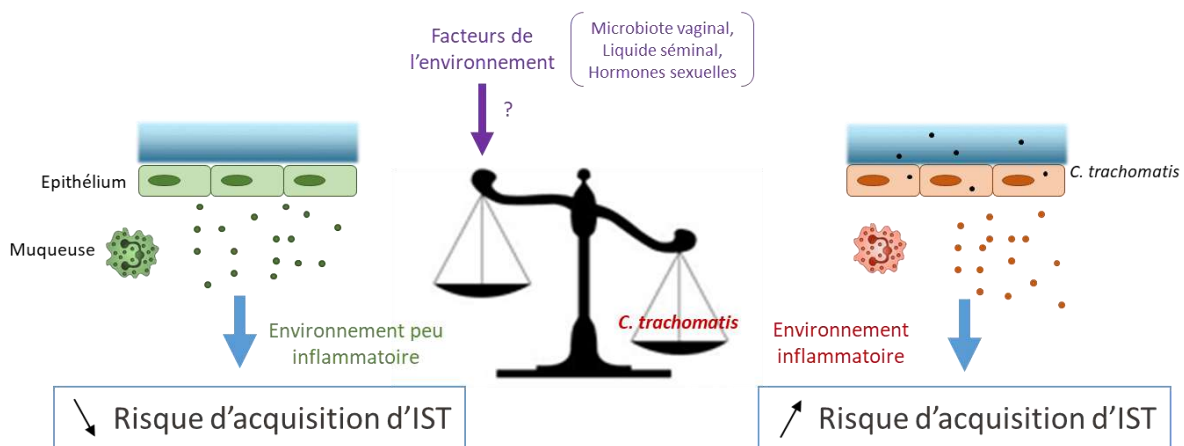


Figure 26 : Schéma des hypothèses testées au cours de la thèse.

Objectifs

Afin de tester ces hypothèses, les différents objectifs étaient de :

- 1) Caractériser les mécanismes impliqués dans l'induction de l'inflammation des muqueuses du TRF lors d'une exposition environnementale (hormones sexuelles, microbiote vaginal ou LS) et/ou en présence d'une infection CT. Plus précisément, nous avons :
 - a. Caractérisé la réponse épithéliale et muqueuse en termes de réponse cytokinique.
 - b. Caractérisé le phénotype et la fonction des neutrophiles (survie, capacité de phagocytose, production de ROS et NETose).
- 2) Caractériser l'impact d'une exposition environnementale (microbiote vaginal ou LS) sur la susceptibilité à l'infection CT et les conséquences des modifications au niveau du TRF sur la susceptibilité à la co-infection VIH-1.

Pour répondre à ces objectifs, deux modèles expérimentaux ont été développés : une approche *in vivo* dans un modèle animal pré-clinique : le macaque cynomolgus, et un modèle humain *in vitro*, permettant de disséquer les mécanismes impliqués.

Nous avons :

- I) Étudié *in vitro* l'impact du LS sur l'infection CT et sur l'inflammation
- II) Caractérisé l'inflammation génitale et systémique en condition physiologique *in vivo*.
- III) Étudié *in vivo* l'impact du LS sur l'inflammation en condition physiologique ou dans un contexte d'infection CT.
- IV) Étudié *in vitro* l'impact de la composition du microbiote vaginal sur l'inflammation induite par CT.

Justification des choix des stratégies expérimentales

Approches *in vitro* :

- Les cellules A2EN ont été choisies comme lignée cellulaire en raison de leur origine (cellules épithéliales endocervicales humaines). Elles peuvent exprimer une mucine spécifique de l'endocol (MUC5B) et répondent à différents stimuli par une production de cytokines et/ou de peptides anti-microbiens (expression de récepteurs hormonaux, du TLR3, ...). Ce modèle diffère d'autres types cellulaires (cellules HeLa, HT-3, ...) d'un point de vue fonctionnel et phénotypique et permet l'étude des facteurs régulant l'immunité au niveau du TRF⁴⁴³.
- La durée d'infection et les MOI utilisées pour les différentes bactéries ont été déterminées après différentes mises au point (manuscrit de thèse de Cindy Adapen). Les durées et MOI sélectionnées permettaient une production optimale de cytokines par les cellules A2EN, tout en garantissant une viabilité cellulaire >90% par rapport à la condition non infectée. De plus, pour CT, les MOI sélectionnées permettaient un pourcentage d'infection >30%.
- Le poly(I:C) a été sélectionné comme contrôle positif pour la production de cytokine lors de l'infection CT car c'est un agoniste de TLR3. Le TLR3 a été impliqué dans la réponse à l'infection *Chlamydia*³⁵⁴. Il nous permet de vérifier pour chaque expérience que les cellules A2EN répondent de manière optimale aux différents stimuli.
- *L. crispatus* et *G. vaginalis* ont été choisies pour modéliser un microbiote optimal ou en dysbiose car ce sont les bactéries abondantes dans les microbiotes vaginaux associés respectivement. Plusieurs souches de ces bactéries ont été testées et les souches associées à la meilleure production de cytokines par les cellules A2EN ont été sélectionnées pour les expériences (manuscrit de thèse de Cindy Adapen).

Approches *in vivo* :

- Le modèle macaque cynomolgus a été utilisé car il s'agit d'un modèle pertinent pour la physiologie et la physiopathologie humaine (voir chapitre V de

l'introduction). Le laboratoire d'accueil possède une très grande expertise sur ce modèle.

- Dans les études visant à étudier l'impact du LS *in vivo*, les animaux ont été inoculés avec du LS humain, car il n'était pas possible de recueillir du LS de macaque en quantité suffisante. Par ailleurs, le LS humain a déjà été testé au laboratoire chez le macaque cynomolgus.

Nous avons utilisé un pool de LS humain d'une centaine de donneurs afin d'avoir un stock suffisant pour l'ensemble des expériences *in vitro* et *in vivo*.

RESULTATS

1 ETUDE *IN VITRO* DE L'IMPACT DU LS SUR L'INFECTION CT ET SUR L'INFLAMMATION.

1.1 Introduction et Objectifs

Le sperme est le vecteur principal de *C. trachomatis* lors de la transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme. Le LS, la fraction acellulaire du sperme joue un rôle immunomodulateur au niveau du TRF et peut influencer la susceptibilité à certaines IST telle que l'infection par le VIH-1²³⁶. Cependant le rôle du LS n'a jusqu'à présent pas été exploré lors de l'infection CT. Au niveau du TRF, l'infection par CT des cellules épithéliales induit une production de cytokines pro-inflammatoires et un recrutement de neutrophiles^{349,357}. Le phénotype et la fonction de ces neutrophiles au niveau muqueux sont jusqu'à présent très peu étudié. Leur rôle lors de l'infection CT est partiellement décrit, ils pourraient être à l'origine de la pathologie observée³⁶⁷. La présence de LS lors d'une exposition à CT pourrait modifier la susceptibilité à l'infection et les réponses immunitaires locales. Au cours de cette étude, nous avons développé un modèle expérimental *in vitro* dans le but de caractériser l'impact de l'infection CT en présence ou en absence de LS humain sur la réponse des cellules épithéliales humaines au niveau de la muqueuse du TRF. Nous avons également cherché à comparer l'effet d'un pool de LS à celui de LS isolés chez différents patients, individuellement. Pour se faire, dans les différentes conditions expérimentales, le pourcentage d'infection et la production de cytokines ont été analysés. Nous avons également étudié l'impact de la réponse des cellules épithéliales sur le phénotype et les fonctions des neutrophiles. Ainsi, les surnageants de culture des cellules épithéliales ont été mis en contact de neutrophiles isolés du sang périphérique humain, et leur phénotype, leur capacité de survie, de phagocytose et de production de ROS a été évaluée.

1.2 Résultats

Au cours de l'infection CT, la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales augmente. Le pool de LS inhibe la production de cytokines de manière dose dépendante, dans des cellules infectées ou non par CT. Le LS inhibe également l'infection

CT et modifie le profil d'expression génique des cellules infectées.

Les surnageants de culture des cellules épithéliales dans les différentes conditions expérimentales ont un impact sur le phénotype des neutrophiles, en augmentant l'expression de CD11b, CD32a, CD10, CD101 et CD62L. Les surnageants favoriseraient donc la maturation (CD10 et CD101), l'activation (CD11b et CD32a) et la capacité d'adhésion (CD62L) des neutrophiles. Les surnageants de culture des cellules épithéliales (infectées ou non par CT) mis en présence du pool de LS entraînent une plus forte expression de CD62L sur les neutrophiles par rapport aux autres surnageants, ils favoriseraient donc leur capacité d'adhésion. Concernant leurs fonctions, les surnageants de culture des cellules dans les différentes conditions ont un impact sur la survie des neutrophiles : pour les surnageants de cellules infectées en présence de dilutions élevées du pool de LS, l'effet de CT prédomine avec une survie améliorée des neutrophiles. L'inflammation induite par CT améliore donc la survie des neutrophiles. Au contraire, pour des dilutions faibles du pool de LS, la survie des neutrophiles est plus faible. Les surnageants de culture des cellules épithéliales favorisent la production de ROS et la capacité de phagocytose des neutrophiles, mais il y a peu de différences entre les conditions expérimentales où les cellules sont stimulées, que ce soit par CT ou par le pool de LS. Les fonctions des neutrophiles sont donc améliorées par les surnageants des cellules A2EN, mais la présence de LS ou de CT ne semble pas avoir d'impact suffisant au niveau des cellules épithéliales pour modifier leurs fonctions. Ces résultats ont été obtenus avec un pool de LS présentant un profil inflammatoire modéré. Nous sommes donc en train d'étudier l'impact de LS isolés ayant des caractéristiques différentes (inflammatoires ou non) sur l'infection CT et l'expression de cytokines.

Pour conclure, cette étude propose une approche permettant d'étudier l'impact de l'environnement muqueux sur le phénotype et les fonctions des neutrophiles. Le modèle développé a mis en lumière l'impact de facteurs de l'environnement du TRF, en particulier le LS et l'infection CT, sur l'inflammation au niveau local. Elle souligne également la nécessité d'étudier les IST en tenant compte de la composante LS dans le cas de la transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme.

1.3 Article 1

« Seminal plasma inhibits *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*, and may have consequences on mucosal immunity »

Article en preparation.

Seminal plasma inhibits *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*, and may have consequences on mucosal immunity

Louis Reot¹, Cindy Adapen², Claude Cannou^{1,3}, Natalia Nunez-Fernandez⁴, Laetitia Lacroix¹, Olivier Binois⁵, Nelly Achour-Chneiweiss⁵, Marie-Thérèse Nugeyre^{1,3}, Roger Le Grand¹, Elisabeth Menu^{1,3}

¹Université Paris-Saclay, Inserm, Commissariat à l'énergie Atomique et aux énergies Alternatives (CEA), Center for Immunology of Viral, Auto-Immune, Hematological and Bacterial Diseases [IMVA-HB/Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT)], Fontenay-aux-Roses, France.

²Micalis Institute, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

³Mucosal Immunity and Sexually Transmitted Infection Control (MISTIC) Group, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France

⁴Life&Soft, Fontenay-aux-Roses, France

⁵Unité de Biologie de la Reproduction, Préservation de la Fertilité – CECOS, Hôpital Antoine Bécère, France

Abstract

Seminal plasma (SP) is the main vector for *C. trachomatis* (CT) during heterosexual transmission from male to female. It has immunomodulatory properties and impacts the susceptibility to HIV-1 infection, but its role has not been explored during CT infection. In the female reproductive tract (FRT), CT infection induces cytokine production and neutrophil recruitment. The role of neutrophils during CT infection is partially described, they could be at the origin of the pathology observed during CT infection. During this study, we developed an experimental *in vitro* model to characterize the impact of CT infection and SP on the response of epithelial cells in the FRT. We also studied the impact of the epithelial cell response on neutrophil phenotype and functions. We showed that the production of pro-inflammatory cytokines by epithelial cells increased during CT infection. A pool of SP inhibited cytokine production and CT infection in a dose-dependent manner and altered gene expression profiles of infected cells. The culture supernatants of cells infected or not with CT, in presence or not of the pool of SP, had an impact on neutrophil phenotype and functions: they affected markers of neutrophil maturation, activation and adhesion capacity, as well as the survival, ROS production and phagocytosis ability. These results were obtained using a pool of SP, which had a moderate inflammatory cytokine profile. We are currently studying the impact of individual SP, with various characteristics (inflammatory or not), on CT infection and cytokine expression. This study proposes a novel approach to study the impact of the environment on the phenotype and functions of neutrophils in the FRT. It highlights the impact of the factors of the FRT environment, in particular SP and CT infection, on the mucosal inflammation and the need to take into account the SP component while studying STI during heterosexual transmission from male to female.

Introduction

Sexually transmitted infections (STI) represent a major public health issue, with a growing incidence of several STI, despite the existence of different treatments. Over the last years, *Chlamydia trachomatis* (CT) infection cases increased worldwide, especially in young people^{1,2}. CT is a Gram-negative bacterium that infects preferentially epithelial cells. Serovars D to K are responsible for urogenital infections. There is a real need for prevention methods, because most of the cases of CT infection are asymptomatic, and the infected population represent a reservoir for STI spreading. One of the key issues to develop new preventive strategies is to understand more deeply the role of the local environment during CT acquisition.

In the FRT, CT infection results in a pro-inflammatory cytokine and chemokine response that led to the recruitment of innate, and later adaptive immune cells, allowing the control of the infection³⁻⁵. Persistence of the pathogen results in chronic inflammation and can lead to collateral genital tract tissue damage^{6,7}. Polymorphonuclear leucocytes (PMN) from the blood are the first immune cells recruited to the site of CT infection, but also during semen exposure. Through various antimicrobial activities (degranulation, phagocytosis, reactive oxygen species (ROS) and neutrophil extracellular traps (NET) production ...), they allow pathogen clearance. However, the role of neutrophils during CT infection is not fully understood. They could be the reason for the immune pathology induced during CT infection⁸: in an *in vitro* study, CT enhanced neutrophil responses, characterized by a recruitment of neutrophils to the site of infection, their activation and prolonged survival⁹. However, in other experimental settings, neutrophil responses are counteracted, and neutrophils are paralyzed by CT¹⁰. Moreover, in *in vivo* mouse models, neutrophils can contribute to antibody-mediated protection to CT infection¹¹, or on the contrary, drive CT associated pathology, without reducing the bacterial burden⁸. These studies highlight the need to better characterize the role of those cells during CT infection.

During heterosexual transmission from male to female, the main vector of STI pathogens in the female reproductive tract (FRT) is the seminal plasma (SP)^{12,13}. Very little is known about the role of seminal plasma during CT induced pathology. SP, the acellular fraction of the semen, is composed of various proteins, including pro and anti-inflammatory cytokines¹⁴. It is known to induce an inflammatory reaction in the FRT, leading to cytokine production and the recruitment of neutrophils from the blood^{15,16}. The inflammation induced by SP exposure in the FRT has been linked to the regulation of infectious diseases, notably modifying the risk for HIV-1 acquisition^{17,18}. SP also has strong antimicrobial properties conferred by proteolytic cleavage of semenogelins (the main protein of human semen coagulum), displaying bactericidal activity against various Gram-positive and Gram-negative bacteria¹⁹. However, even if SP has been shown to modulate STI susceptibility and inflammation at the level of the FRT²⁰, the impact of SP is often poorly investigated during CT infection.

In this study, we aimed at characterizing the impact of CT infection in presence or in absence of a pool of SP on epithelial cell response at the level of the FRT mucosa. We also investigated the impact the epithelial cell response on the phenotype and functions of neutrophils. Using an *in vitro* model, we found that SP inhibited CT infection and modified the inflammation induced by the infection, in particular the cytokine profile of CT infected epithelial cells. We also show that the local environment could have an impact on local neutrophil phenotype and functions.

Material and Methods

SP collection

Human seminal plasmas were obtained from the “*Centre d’étude et de conservation des œufs et du sperme humains*” (CECOS) at Antoine Bécère Hospital (Clamart, N. Achour-Chneiweiss’s team). Semen was collected from donors that were involved in *in vitro* fertilization protocol. All methods to recruit participants and collect biological samples were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Participants gave their consent for the use for medical research purposes of the samples. They were informed of the study and gave no objection for the use of their samples and data for the study.

The study was defined as a non-interventional study by French Ethical Committee ‘Comité de Protection des personnes’ (n° 2014/42NICB). The study complies with the methodology reference MR-004 set out by the French data protection authority (‘Commission Nationale de l’Informatique et des Libertés’ CNIL) for which Institut Pasteur Paris made a statement compliance with the CNIL (n° 2214728v0). The study was registered on the public directory of the health data hub HDH (N° F20220617111005).

All semens were negatively tested for HBV, HCV, HIV, Syphilis, Chlamydia and other bacterial infections by spermaculture. Seminal plasma was obtained after semen centrifugation on gradient density.

Seminal plasma from about 100 donors were pooled, aliquoted and characterized for cytokine concentration. About 30 individual seminal plasma were also stored.

Cell line culture

A2EN is a human endocervical epithelial cell line, generated in the laboratory of Dr A. Quayle from primary epithelial cells isolated from endocervical explant, and immortalized with human papilloma virus E6 and E7²¹. A2EN cells (Kerafast) were grown in phenol red-free serum-free medium (EpiLife; Cascade Biologics) with an EpiLife Defined Growth Supplement (EDGS; Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (PS) and 0.004M of CaCl₂ (Sigma Aldrich). The cells were grown at 37°C with 5% CO₂. In the following experiments, high molecular weight (HMW) poly(I:C) (100 µg/mL) was used as a positive control for A2EN cell cytokine production.

C. trachomatis infection

Chlamydia trachomatis serovar D (D/UW3/Cx) was obtained from Statens Serum Institut (Copenhagen, Dr Follmann laboratory). A2EN cells were seeded in EpiLife medium with EDGS, CaCl₂ and PS in 24 well plate at 5.10⁴ cells/well. After 96h, confluent A2EN cells were washed, and fresh EpiLife medium without PS containing, or not, various dilutions of SP (1/10, 1/50, 1/100 or 1/500) was added. The cells were immediately infected with CT svD at different multiplicity of infection (MOI) (12, 25 or 50) by centrifugation (700 g) for one hour. Then, culture medium was removed and DMEM with 10% SVF was added. The cells were incubated for 24h at 37°C with 5% CO₂. After 24h, pH measurement (Fisherbrand™ pH Indicator, 6.4-8) and viability test (CellTiter®) were performed. Supernatants were collected and frozen at -80°C after 0.2µm filtration. For the determination of the percentage of infection, cells were fixed and stained using a rabbit anti-chlamydia heat shock protein 60 (Hsp60) antibody (provided by A. Subtil, Institut Pasteur, France) diluted at 1:2000 in BSA for 1h. Then, cells were treated with anti IgG Rabbit – AF488 (1/500), DAPI and Phalloidin for 1h. Inclusions were quantified in infected cells using an inverted microscope (Zeiss® Axiovert 25). The percentage of infection was determined by dividing the number of inclusions containing cells by the total number of cells.

RNA extraction and sequencing

At the desired timepoints, cells were lysed and lysates stored at -80°C for RNA extraction. RNA was extracted using NucleoSpin RNA XS kit (Macherey Nagel) according to manufacturer instructions. RNA was quantified using QuBit RNA HS kit (ThermoFisher), and a quality check was performed on the Agilent TapeStation system. A total of 1000 ng of RNA per sample was denatured at 65°C and retrotranscribed by a strand-switching technique using Maxima H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFisher, USA) to synthesize a double stranded cDNA. PCR, barcode, and adapter attachment were performed according to Direct cDNA Native Barcoding protocol (SQK-DCS109) with barcoding (EXP-NBD104) (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). Samples were quantified using QuBit dsDNA HS (ThermoFisher, USA) kit before loading on R9.4.1 Flow cells using the GridION instrument (Minknow version 21.11.7).

Transcriptome Analysis

Sequence reads were converted into FASTQ files. Reads under 300 bp or with a quality score under 9 were discarded. The remaining reads were aligned on the human GRCh38.p13 and *C. trachomatis* D/UW-3/CX strain transcriptome of reference (GeneBank assembly accession numbers GCA_000001405 and GCA_000008725 respectively) using minimap2 (refs 2018 : <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/34/18/3094/4994778> et 2021 : academic.oup.com/bioinformatics/article-abstract/37/23/4572/6384570?redirectedFrom=fulltext) version 2.24. To quantify transcripts, the resulting alignments were given to Salmon version 1.8.0²². To explore differentially expressed genes, replicates count data were used on DESeq2 version 1.32.0²³ in one single DEseq model. Gene set enrichment analysis with both upregulated and downregulated genes $\text{Log}_2\text{FC} > 1.5$ or $\text{Log}_2\text{FC} < 1.5$, respectively was performed using Enrichr, a web server enrichment analysis tool^{24,25}, and BioPlanet 2019 database for cellular and signaling pathway analysis²⁶.

Cytokine and Chemokine quantification

Pro- and anti-inflammatory cytokines were measured in the A2EN cell culture supernatants and in the seminal plasma by a 25plex assay for the detection of: IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-15, IL-17, TNF α , IFN α , IFN γ , GM-CSF, CCL3, CCL4, CXCL10, CXCL9, CCL11, CCL5 and CCL2 (Human cytokine magnetic 25-plex panel; Life technologies).

TGF- β 1, 2 and 3 were detected with another multiplex assay (MILLIPLEX MAP TGF β Magnetic Bead 3 Plex Kit; Merck Millipore).

Neutrophil isolation, phenotype and functional analysis

Human neutrophils were isolated from human blood, obtained from blood donors at *Etablissement Francais du Sang* (EFS, France; C CPSL UNT- N°13/EFS/101), using the EasySep™ Direct Human Neutrophil Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (StemCell Tech, Vancouver, BC, Canada). Each sorting resulted in more than 90% neutrophils, confirmed by phenotype analysis. $2 \cdot 10^5$ neutrophils were incubated at 37°C or at 4°C (only for the phagocytosis assay) in a 96-well plate containing an equal volume of RPMI+10% SVF and of A2EN supernatants or DMEM+10% SVF. Phenotype and functional analysis were performed at various time post-incubation. Survival of the neutrophils was followed at 2h, 6h, 24h and 48h using an apoptosis detection kit with PE-Annexin V and 7-AAD (Biolegend), according to the manufacturer instructions. At 2h post-incubation, neutrophils were tested for ROS production and phagocytosis capacity. For the phagocytosis assay, pHrodo™ Red *E. coli* BioParticles™ Conjugate for phagocytosis (Invitrogen™) were added to the neutrophils at a 1:1 ratio for 5min, then cells were washed

and fixed using 1% PFA until flow cytometry analysis. For the ROS production assay, neutrophils were washed and incubated at 37°C for 90min in PBS containing 10 μ M Luminol (Sigma-Aldrich). PMA (0,1ng/ μ L, Sigma-Aldrich) was added 0min or 50min after the addition of the Luminol. Luminescence was followed every min using a multimode microplate reader, the Spark 10M (TECAN; Switzerland). The phenotype of the cells was studied after 6h of incubation, after staining of the neutrophils for 10min at 4°C with the antibodies listed in Table 1. A ZE5 flux cytometer was used (Biorad) with Everest (Biorad) and FlowJo (Tristar, USA) software packages for the flow cytometry analysis. A representative image of the gating strategy is illustrated in Supplementary Figure 1.

Table 1: Antibody panel used to characterize neutrophil populations.

Antibody	Clone	Label	Laser-filter	Reference	Volume/test (μ L)
Bluevid			355-450/50		
CD64	10.1	BUV737	355-740/35	564425	3
CD14	REA599	Vioblue	405-450/50	130-110-5224	2
CD45	REA1023	Viogreen	405-525/50	130-177-193	2
CD3	SP34.2	BV650	405-660/20	563916	2
CD123	7G3			563405	5
CD8a	RPAT8			563821	2
CD20	2H7			563780	2
CD62L	SK11	BV711	405-710/50	565040	2
CD11b	REA713	FITC	488-530/30	130-110-552	2
CD10	HI10a	PercP-Cy5,5	488-695/40	312216	5
CDw125	REA705	PE	561-585/15	130-710-544	2,5
PD-L1	29E.2A3	PE-Dazzle 594	561-610/20	329732	3
CD101	REA954	PE-Vio770	561-780/60	130-115-832	2
CD32a	IV.3	AF647	640-670/14	60012	0,6
HLA-DR	L234	AF700	640-730/45	307626	1
CD66	TET2	APC-vio770	640-780/60	130-101-132	2

Statistical analysis

GraphPad prism software version 9 for windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) was used for graphical representations and area under the curve (AUC) calculation. Two-way ANOVA test with p values adjustment with Tukey's test was used for statistical analysis.

Results

SP composition

The pool of SP was characterized in terms of cytokine/chemokine concentrations (Figure 1). The pool of seminal plasma had a moderate inflammatory profile, with some pro-inflammatory cytokines expressed (IL-8, CCL2, CXCL9) but also anti-inflammatory cytokines (TGF- β , IL-1RA). As expected²⁷, TGF- β 1, - β 3 and - β 2, respectively, were the most prevalent cytokines in seminal plasma with a combined concentration for TGF- β of 234,4 ng/mL.

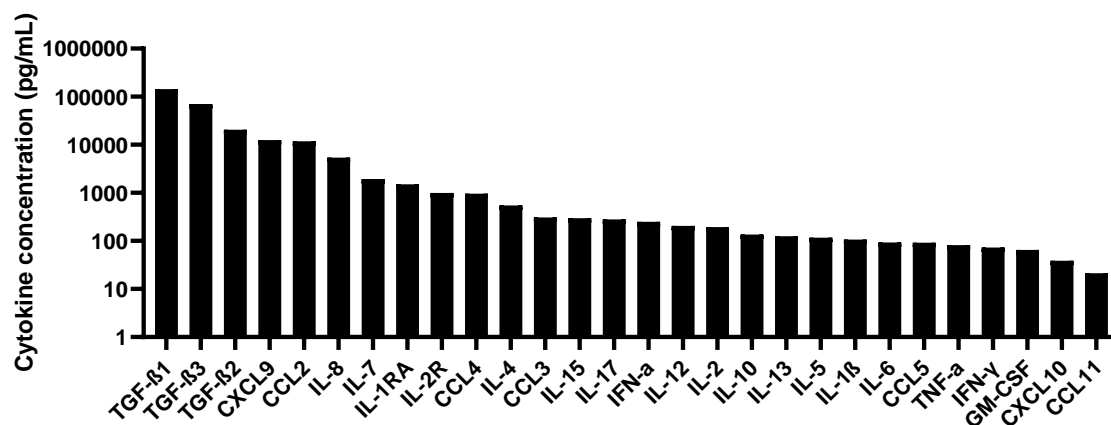


Figure 1: Cytokine characterization of the pool of SP. Seminal plasma from about 100 donors were pooled and the cytokine concentration of the pool was characterized by Luminex®.

SP inhibited CT infection of A2EN cells

The effect of the pool of SP was examined on A2EN cells infected with CT. Since pure SP could affect the viability of epithelial cells *in vitro*, we tested several dilutions of SP in PBS, starting with a 10-fold dilution, to approximate the physiological situation in the FRT after intercourse²⁸. No effect was detected on cell viability: the pH of A2EN supernatants and the metabolic activity of the cells were similar in all the conditions tested (Figure 2A, 2B). We then determined the percentage of CT infection in the various conditions by immunofluorescence. A representative image is illustrated Figure 2C. We quantified the cells that had at least one inclusion and determined that the presence of SP reduced drastically the percentage of CT infected cells analyzed 24h post-infection (Figure 2D). This effect was dose dependent: the percentage of infection decreased with the SP concentration. Indeed, the 10-fold dilution of SP was the most potent to reduce the percentage of CT infection, with 10-fold less infected cells compared to the condition without SP. We then tested if this effect could be observed using different experimental conditions. The results represented in Supplementary Figure 2 show that SP also inhibited CT infection at higher MOI or at 48h post-infection. Uninfected A2EN cells produced various cytokines including CXCL10, IL-6, GM-CSF and a high concentration of IL-8 (Figure 3A). Stimulation with poly(I:C), strongly increased A2EN cell production of several proinflammatory cytokines, including CCL5, CCL3, CXCL10 and IL-6 (Fig 3B). CT infection induced an increase in inflammatory cytokines concentration (IL-6, GM-CSF and CXCL10), but lower than poly(I:C). In contrast, when cells were exposed to SP alone, a decrease in the concentrations of those same cytokines was observed in a dose dependent manner (Figure 3B). When A2EN cells were exposed to CT in presence of SP, the cytokine profile was dependent on the dilution of SP: the effect of SP predominated for low dilutions, with a decrease in cytokine concentration. On the contrary, for high dilutions, the effect of CT predominated, with an increase in inflammatory cytokine concentration. In conclusion, SP inhibited CT infection and decreased the inflammation induced by CT.

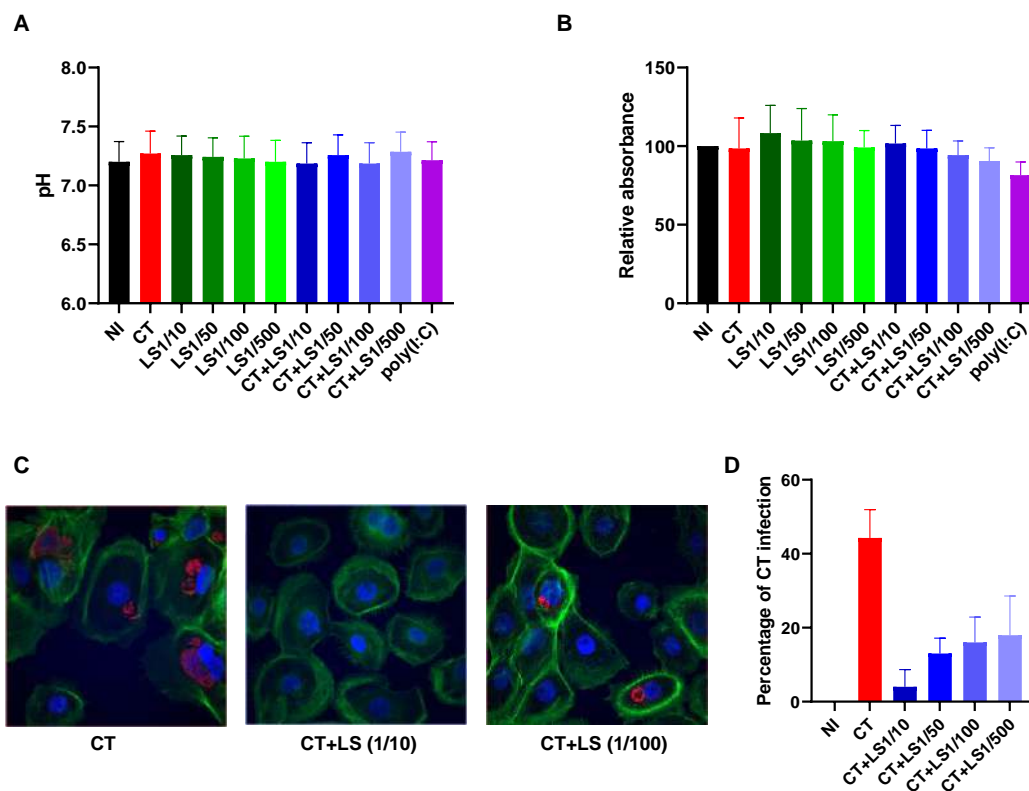


Figure 2: Impact of the pool of SP on CT infection of A2EN cells. Cells were infected or not with CT at a MOI of 12, in the presence or not of different dilutions of SP, for 24h (n=4). Poly(I:C) was used as a positive control. (A) pH was measured in the supernatants. (B) A2EN viability was evaluated using CellTiter and the relative absorbance was measured. (C) The percentage of infection was determined by immunofluorescence. Actin filaments in the cytoplasm are in green (Phalloidin), the nucleus in blue (DAPI), and the CT inclusions in red (Hsp60 antibody). (D) Percentage of CT infection (number of infected cells/total number of cells) at 24hpi by quantification of the inclusion in A2EN infected cells.

SP induced transcriptional changes in A2EN cells

To address the mechanism of the inhibition of CT infection of A2EN cells by SP, a transcriptomic analysis of A2EN in various experimental conditions was performed (Figure 4). In poly(I:C) stimulated A2EN cells, 72 genes were differentially expressed compared to the untreated condition, and among those gene, the 49 overexpressed genes, were mainly enriched in biological pathways involved in interferon response, as expected. In CT infected A2EN cells, four CT proteins are detected at 24h in the transcriptomic profile of A2EN cells. Moreover, several eukaryotic genes are differentially regulated following the infection: for example, MSTO1, NDE1, ZNF33B, PDXDC1 or THOP1, involved in various metabolic processes and in the regulation of the cell cycle are upregulated. During SP exposition, genes that are differentially regulated are factors involved in the regulation of the transcription (ex: TRIM27, ZNF431) or protein coding gene related to protease (ex: MMP1, SERPINB2). When A2EN cells are infected with CT in presence of SP, only one CT gene is detected at 24h post-infection (CT_480.1). Moreover, for some genes, the cells present the same expression pattern as the A2EN cells exposed only to SP (ex: TOP3A) or only to CT (ex: MED13). In contrast, other genes are only differentially expressed in A2EN cells exposed to both SP and CT (ex: ATF7, HERC2, HMGB3, NUCB2, RNF10, SVIL-AS1, AC139256.2).

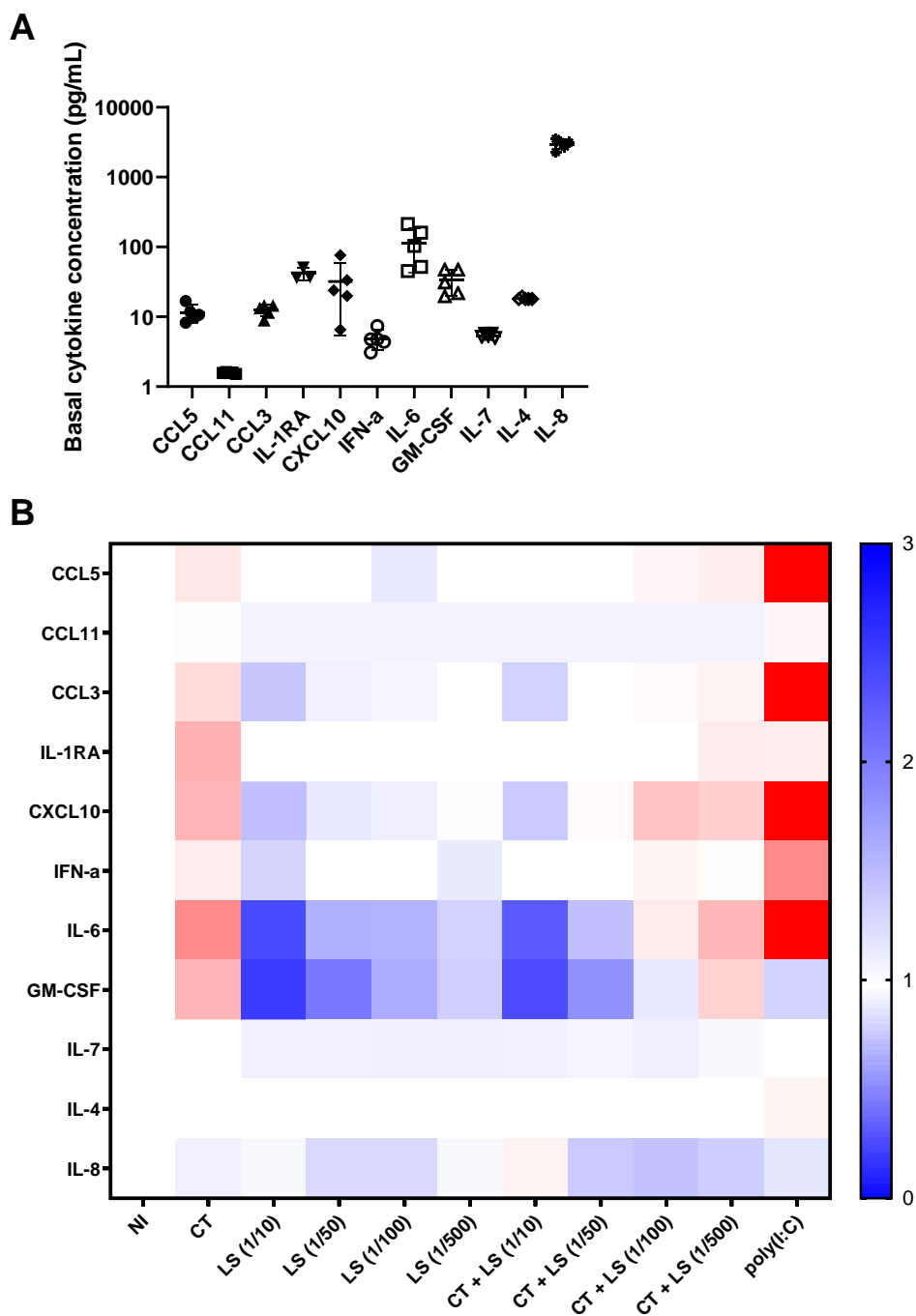


Figure 3: Impact of the pool of SP on cytokine expression by A2EN cells infected with CT. Cells were infected or not with CT at a MOI of 12 for 24h, in the presence or not of different dilutions of SP (n=5). Poly(I:C) stimulation was used as a positive control. The cytokines in the culture supernatants were quantified by Luminex®. (A) Cytokine concentration in uninfected A2EN cells. Only detectable cytokines are shown. (B) Variation in cytokine expression after CT infection, with or without SP treatment. Increase in cytokine concentration is represented in red, decrease in blue.

Those genes present mainly a DNA binding and transcription regulation function. Some of them are also involved in innate immune responses. To sum up, CT and SP both induce transcriptional changes in A2EN

cells. In A2EN cells infected with CT in presence of SP, the transcription profile observed is even different from the one of the non-infected and/or non-SP exposed cells. CT genes are also affected by the presence of SP.

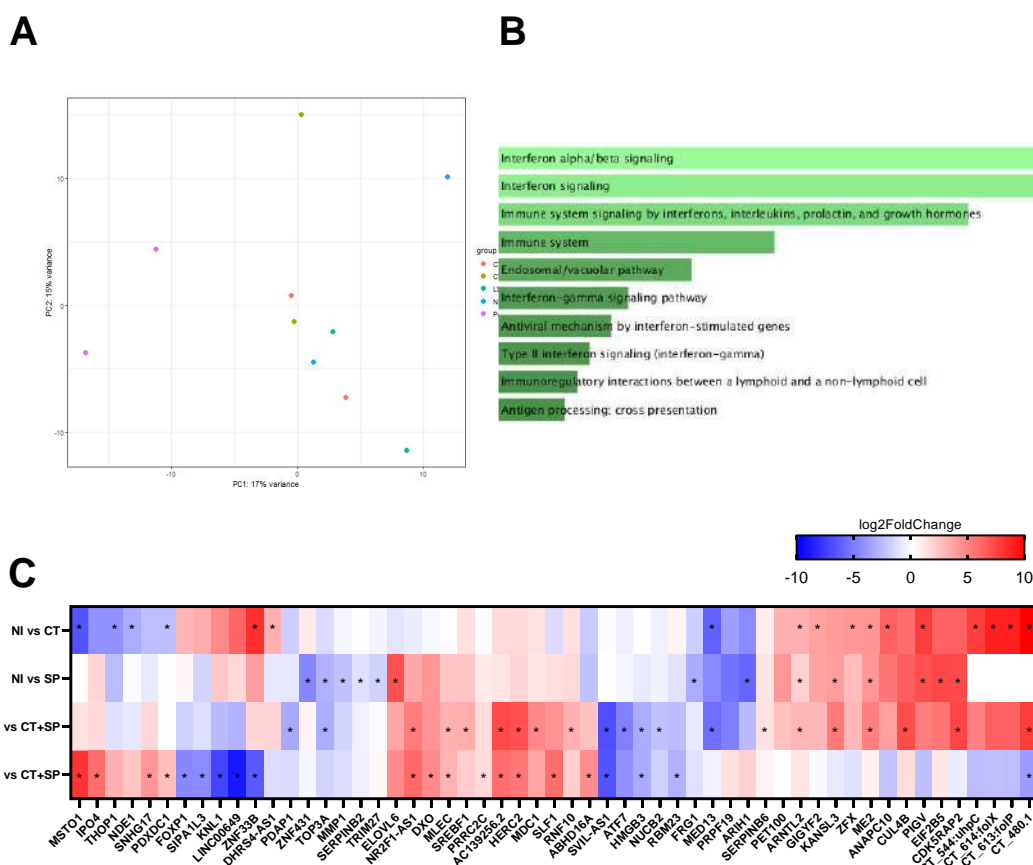


Figure 4: Transcriptomic analysis of A2EN cells infected with CT in presence or not of SP. Cells were infected or not with CT at a MOI of 12 for 24h, in presence or not of a 10-fold dilution of SP and were then lysed for transcriptomic analysis (n=2). (A) Principal component analysis (PCA) of NI, CT, SP, CT+SP and poly(I:C) samples. (B) Pathway enrichment for the 72 host-responding genes to poly(I:C) stimulation compared to the non-stimulated condition. (C) Top 55 host-responding gene or *C. trachomatis* gene expression in A2EN cells exposed to CT, SP or CT+SP. The log₂ fold change in gene expression was calculated using Enrichr, and is represented compared either to the uninfected/unstimulated (NI) condition or to CT infected cells (*: adjusted p-value < 0.05).

Impact of A2EN supernatants on neutrophil phenotype and functions

Given the modifications induced by SP ± CT on epithelial cells, we wondered if the variations in the cytokine concentrations could have an impact on the underlying cells in the mucosa. We focused our study on neutrophils since they are the first cells recruited to the site of inflammation. When recruited, neutrophils mostly come from the blood²⁹, so we used neutrophils isolated from human blood to assess the impact of A2EN supernatants on their phenotype and functions.

Phenotype

First, neutrophil phenotype was analyzed at 0h and 6h post sorting (Supplementary Figure 3). In DMEM medium, the neutrophil phenotype was comparable between 0h and 6h post sorting, except for a major decrease in CD62L, and a small decrease in CD101 expression. Then, we assessed the impact of A2EN supernatants on neutrophil phenotype after 6h of culture. PD-L1 expression on neutrophils was not affected by A2EN supernatants. All supernatants had a quite similar effect on other cellular markers, with an increase in CD11b, CD32a, CD10, CD101 and CD62L expression on neutrophils (Figure 5). However, the significance threshold was not reached for all conditions: when neutrophils were treated with non-infected A2EN cell supernatants, there was no significant increase in CD10. Moreover, CT infected A2EN cell supernatants did not significantly increase CD62L expression. The A2EN supernatants resulted in at least a 2.5-fold increase in the mean fluorescence intensity (MFI) of CD11b, CD32a and CD62L, whereas the increase in the MFI of CD10 and CD101 was less important and did not exceed 100%. Finally, the decrease in CD62L expression observed in neutrophils after 6h of culture was less drastic when neutrophils were treated with A2EN supernatants, and more particularly with supernatants from A2EN cells treated with a 10-fold dilution of SP. In those conditions, the MFI was at least 7 times more important compared to the DMEM condition. The difference in CD62L MFI was significantly different between the NI and SP (1/10) conditions, but it was only a tendency ($p=0,2$) between the NI and CT+SP (1/10) conditions. In conclusion, in all the tested conditions, A2EN supernatants increased the expression of several surface markers in blood neutrophils.

Survival

Neutrophil survival was evaluated at 2h, 6h, 24h and 48h post sorting (Figure 6A). In DMEM medium, the survival of the neutrophils was drastically reduced as soon as 6h post sorting and continued to diminish at 24h, with 60% and 20% of cell survival respectively. In contrast, A2EN supernatants enhanced significantly neutrophil survival after 6h of culture ($p<0.01$), with at least 13% and 40% of cell survival at 6h and 24h respectively. More precisely, at 24h of culture, supernatants of A2EN cells infected with CT promote neutrophil survival (67.3% of neutrophil survival) compared to the conditions without CT (at best 51.7% of neutrophil survival) (Figure 6B). SP also had an effect because supernatants from CT infected A2EN cells, treated with various dilutions of SP, affected the neutrophil survival in a dose dependant manner. Indeed, while SP dilution increased, CT infected A2EN supernatants increased the survival of the neutrophils (from 40.6% of neutrophil survival in the 1/10 dilution to 57.5% of neutrophil survival in the 1/500 dilution). Altogether, when treated with SP, the effect of CT infected A2EN supernatants was dependent on the SP dilution: at high SP dilutions, the effect of CT predominated with an enhanced survival of the neutrophils comparing to low dilutions (Figure 6B).

ROS production

Neutrophils were incubated 2h with DMEM medium or A2EN supernatants, and ROS production was evaluated by stimulating neutrophils with PMA and monitoring the emission of light by oxidized luminol. A representative graph of the 90min follow-up is illustrated Figure 7A and Figure 7C. When a PMA stimulation was performed at $t=0h$ (Figure 7A and 7B), neutrophils cultured in DMEM medium were less susceptible to PMA induced ROS production than neutrophils in A2EN treated with SP or poly(I:C) supernatants (Figure 7B). Moreover, in DMEM medium, the peak of ROS production occurred a few minutes later than for neutrophils in A2EN supernatants (Supplementary Figure 4). Without any PMA stimulation, ROS production by neutrophils was very weak and did not differ between the experimental

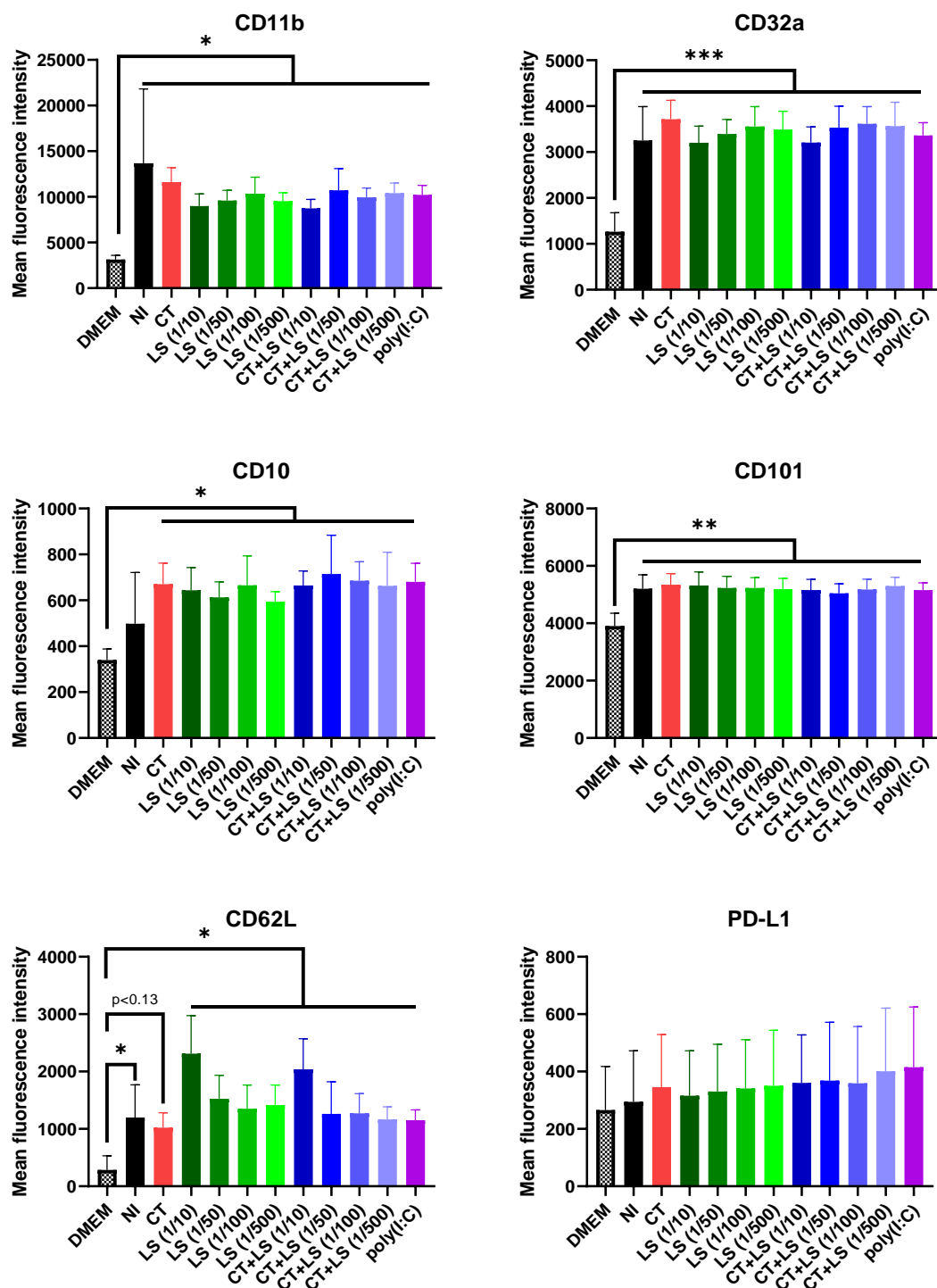


Figure 5: Impact of the A2EN supernatants on blood neutrophil phenotype. A2EN cells were infected or not with CT at a MOI of 12, in the presence or not of different dilutions of SP (n=4). Poly(I:C) was used as a positive control. After 24h, the supernatant was collected and used on neutrophils isolated from the blood. Neutrophil phenotype was then analyzed after 6h of incubation, using antibodies listed in Table 1. The mean fluorescence intensity of CD11b, CD32a, CD10, CD101, CD62L and PD-L1 was studied in neutrophils (CD45⁺ CD66⁺ Lin(CD3, 8, 14, 20, 123, 125)⁻; CD14⁻, CDw125⁻). Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test (*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001).

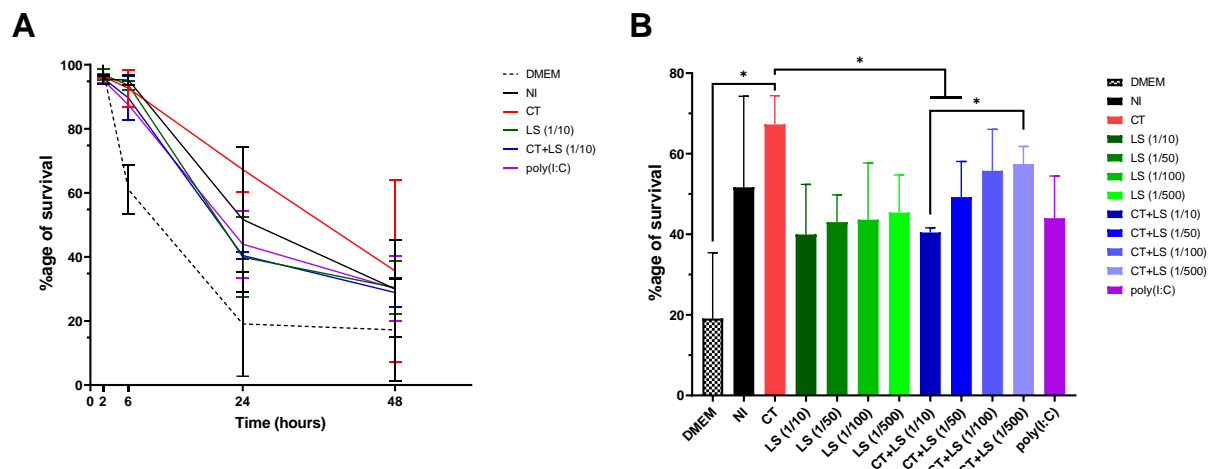


Figure 6: Impact of the A2EN supernatants on blood neutrophil survival. A2EN cells were infected or not with CT at a MOI of 12, in the presence or not of different dilutions of SP (n=4). Poly(I:C) was used as a positive control. After 24h, the supernatants were collected and used on neutrophils isolated from the blood. Neutrophil survival was then studied after 2h to 48h of incubation, using antibodies AnV and 7-AAD. Live cells (AnV⁺ 7-AAD⁻) were quantified among neutrophils using FlowJo software. (A) Kinetics of the neutrophil survival. Results are expressed as a percentage of survival. (B) Variation of neutrophil survival after 24h of incubation with the different A2EN supernatants. Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test (*p ≤0.05).

conditions, but neutrophils were still able to produce ROS upon later PMA stimulation (Figure 7C). After 50min in PBS, PMA stimulation induced a ROS production by neutrophils in all experimental conditions. Neutrophils cultured in DMEM medium tended to induce less ROS production than neutrophils in A2EN treated with SP or poly(I:C) supernatants, even if the difference was not significant (Figure 7D). In conclusion, poly(I:C) and SP treated A2EN cell supernatants are potent activators of PMA induced ROS production in neutrophils.

Phagocytosis

Neutrophil phagocytic capacity was evaluated at 2h post sorting, at 37°C and 4°C. The MFI of neutrophils was evaluated to assess their phagocytic capacity (Figure 8A). The MFI for all experimental conditions at 4°C was lower than at 37°C ($MFI_{max\ 4^\circ C} = 57$ whereas $MFI_{min\ 37^\circ C} = 138$). The minimal MFI at 37°C was obtained for neutrophils cultured in DMEM medium, and 58% of neutrophils were engaged in the phagocytosis process (data not shown). When they were cultured in A2EN supernatants, the phagocytosis activity was increased and at least 83% of neutrophils were engaged in the phagocytosis process (data not shown). The MFI of the neutrophils in uninfected A2EN supernatants was significantly lower than for the other A2EN supernatants, meaning that their phagocytic activity was significantly increased (Figure 8B). Indeed, supernatants of stimulated A2EN cells caused an increase of at least 70% of neutrophil phagocytic capacity compared to uninfected A2EN supernatants. In conclusion, A2EN cell supernatants, and more particularly stimulated A2EN cell supernatants are potent activators of phagocytic capacity in neutrophils.

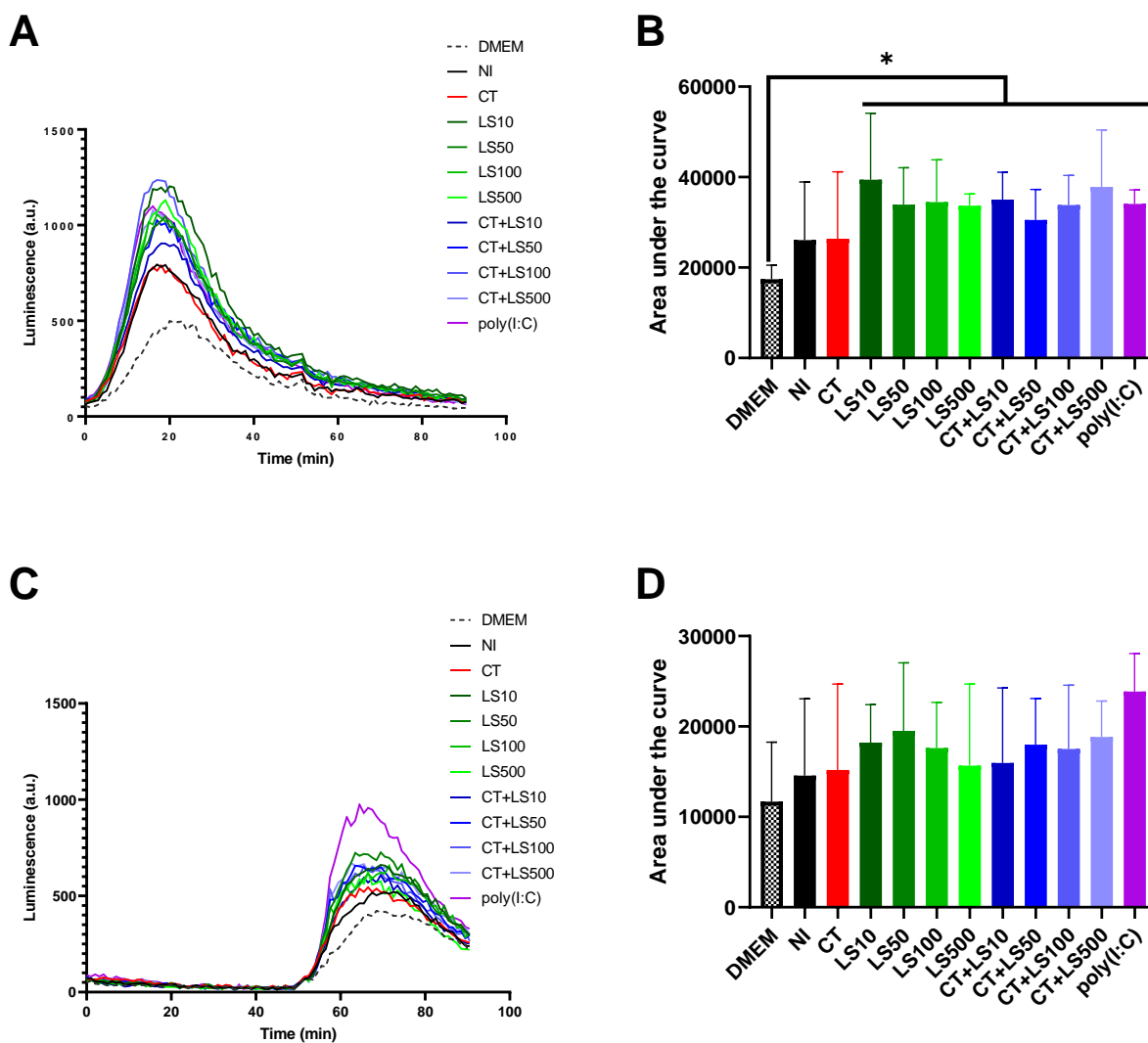


Figure 7: Impact of the A2EN supernatants on blood neutrophil ROS production. A2EN cells were infected or not with CT at a MOI of 12, in the presence or not of different dilutions of SP (n=4). Poly(I:C) was used as a positive control. After 24h, the supernatants were collected and used on neutrophils isolated from the blood. After 2h of incubation, ROS production was evaluated for 90min by monitoring luminescence emitted by oxidized luminol. PMA was added to stimulated ROS production, either directly at t_0 (A, B) or after 50min of luminescence monitoring (C, D). A representative read-out of the experiment is provided in both cases (A, C). The area under the curve is also represented in both cases (B, D). Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test (* $p \leq 0.05$).

Discussion

The environment of the FRT, and more particularly the inflammation, is particularly important for the establishment of STI. However, the underlying mechanisms are often poorly or not documented, particularly in the context of co-infections³⁰. During this study, we developed an *in vitro* model aiming at better understanding the role of the SP and the mucosal environment (in terms of inflammation) during CT infection. This model allows to study sequentially the different steps occurring at the level of the FRT *in vivo* during CT infection: epithelial cells are infected by CT in presence of SP, then the epithelial cells secrete inflammatory mediators which act on cells in the *lamina propria*.

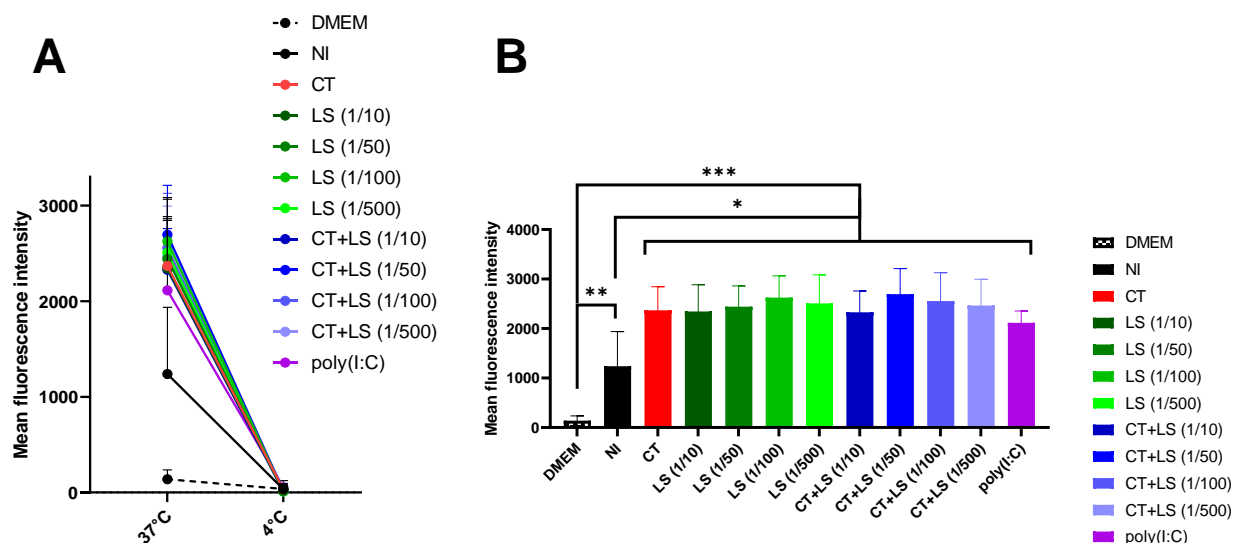


Figure 8: Impact of the A2EN supernatants on blood neutrophil phagocytosis capacity. A2EN cells were infected or not with CT at a MOI of 12, in the presence or not of different dilutions of SP (n=4). Poly(I:C) was used as a positive control. After 24h, the supernatants were collected and used on neutrophils isolated from the blood. After 2h of incubation, fluorescent *E. coli* particles were added to the neutrophils for 5min, cells were then fixed and the mean intracellular fluorescence was assessed by flow cytometry. (A) Comparison of the mean fluorescence intensity reflecting the phagocytic capacity in the different experimental conditions at 37°C and 4°C. (B) Impact of A2EN supernatants on neutrophils at 37°C. Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test compared to the baseline (*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001).

In the FRT, CT infects epithelial cells, mostly from the vagina and the cervix⁶. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that SP is a potent immunomodulator and affects STI acquisition, either positively or negatively³¹. During male to female transmission of CT, SP acts as a vehicle for the bacterium. In this study, we reported for the first time that SP inhibits CT svD infection of human endocervical epithelial cells. The analysis of the transcriptional profile of A2EN infected with CT in presence or not of SP revealed that CT gene were more detected without SP than with it. This suggests a delay in the CT growth in presence of SP. Several host genes were also differentially regulated by SP and/or CT. However, we were not able to find general pathways implicated during SP and/or CT exposition. This could be due to the sequencing experiment protocol: it was performed using a direct cDNA-based technology, leading to a limited number of differentially expressed genes between the experimental conditions. Moreover, the analysis was performed 24h post CT infection, which might be too early to see the bacterial gene evolution following the infection, since CT complete its life cycle in 48h to 72h³².

A2EN cells infected with CT produce pro-inflammatory cytokines at 24 hpi, but the increase in cytokine concentration was relatively modest compared to poly(I:C) stimulation, as already reported in the literature⁵. For example, IL-8 concentration was not increased by CT or by poly(I:C), or in any other of the experimental conditions. Buckner et al., showed that it was possible to stimulate the production of IL-8 by A2EN cells using poly(I:C), but these results were obtained in different experimental conditions, and polarized cells. Also, the basal level of IL-8 was already very high at baseline in our experiments, as it has been reported at the level of TRF³³. This high level of IL-8 has been associated with the recruitment and activation of immune cells⁶.

On the other hand, SP had an anti-inflammatory effect on epithelial cells. The pool of SP we used had a moderate inflammatory profile, and TGB- β was the most concentrated cytokine. This cytokine could be the main modulator of A2EN cytokine production, since it is a known modulator of cytokine production in other cervical cell lines³⁴. It has been involved in numerous immunomodulatory processes, notably in accommodating the foreign alloantigens to promote immune tolerance to favor a successful pregnancy³⁵. Nevertheless, the anti-inflammatory properties of the SP observed in this study are in contrast to what has been described after a SP inoculation in the FRT mucosa *in vivo*³⁵. This difference can be explained because the *in vitro* model does not take into account the complexity of the FRT, which contains a diversity of cells (including resident immune cells) that could be responsible for the pro-inflammatory reaction to SP. The cytokines found in the supernatants of A2EN cells infected with CT with SP seem to confirm the anti-inflammatory effect of SP on epithelial cells: the presence of SP leads to modifications in the expression of cytokines by CT-induced A2EN cells. These modifications may be due either to the fact that SP interfere with CT infection cycle, and/or to an additive effect: the expression profile obtained corresponds to the sum of the two profiles obtained with the SP and CT.

We then tested the impact of A2EN supernatants on neutrophils isolated from the blood, since those cells are rapidly recruited after CT infection⁶. However, neutrophils were directly isolated from the peripheral blood, and thus their phenotype may differ from extravasated neutrophils located *in vivo* at the site of CT infection. We showed that A2EN supernatants affect the phenotype of neutrophils, increasing the level of CD11b, CD32a, and CD62L on the one hand, suggesting an activation of neutrophils and increasing the levels of CD10 and CD101 on the other hand, suggesting a maturation of neutrophils³⁶. For most surface markers, there was no difference according to the A2EN supernatants used, so this argues that those phenotypes could be associated to highly concentrated cytokines in all A2EN supernatants such as IL-8, also found in high concentration at the level of the FRT, and that has an impact on neutrophil *in vivo*. We also observed a greater expression of CD62L, a L-selectin involved during diapedesis, when neutrophils were inoculated with SP treated A2EN supernatants. This could be due to IL-6 or more probably GM-CSF, because those two cytokines are strongly decreased in SP treated A2EN supernatants. Indeed, GM-CSF has been shown to impact neutrophil surface marker expression³⁷: for example, a GM-CSF stimulation has been shown to reduce CD62L expression at the level of neutrophils or eosinophils^{38,39}.

Regarding the functions of neutrophils, the effect of A2EN supernatants was heterogeneous according to the function studied. For the survival assay, the effect of A2EN supernatants was in line with their cytokine profile: each condition had a different effect, with CT infected cells conferring the highest neutrophil survival. For CT infected cells, the effect of SP also depended on the dilution: at high dilutions, the effect of CT dominated with an enhanced neutrophil survival compared to low dilution. We can thus argue that the cytokines that are differentially expressed in the supernatants of A2EN cells infected with CT (namely CCL5, CCL3, CXCL10, IL-6 or GM-CSF) may impact neutrophil survival. Concerning phagocytosis and ROS production, all A2EN supernatants increased these functions in neutrophils, suggesting that highly concentrated cytokines in all A2EN supernatants (such as IL-8), could impact neutrophil phagocytosis and ROS production. Indeed, IL-8 has been shown to be able to prime neutrophils⁴⁰, in presence of a second stimulus such as LPS, neutrophil activation can trigger phagocytosis and ROS production⁴¹. We also demonstrated that the supernatants of non-infected A2EN cells had a lower impact on neutrophil phagocytic activity compared to the other A2EN cells supernatants. This would suggest that the stimulation of A2EN cells create an environment that promotes the phagocytosis of neutrophils.

We showed that SP could impact the inflammation at the level of the FRT during CT infection. Those modifications could also impact the risk for STI acquisition and lead to co-infections, so we also tested the

impact of A2EN supernatants on the susceptibility to HIV-1 infection. However, we were not able to highlight significant differences in U87-CD4-CCR5 susceptibility to a virus pseudotyped with HIV-1 R5 envelope or with VSV-G protein. This model allowed to assess the effect of A2EN supernatants in a simplified system with a one cycle viral replication and to evaluate if the supernatant's impact was occurring at the step of the viral entry. However, it does not recapitulate the full diversity of the immune cells present at the level of the FRT, nor the complexity of a clinical isolate of HIV-1. A2EN supernatants could thus be tested on cells isolated from the FRT, and infected with HIV-1_{BaL}, a R5-tropic virus. Overall, our results highlight the need to take into account SP when studying the mechanisms of STI acquisition. SP has a significant impact on the susceptibility to CT infection and on the innate immune responses to the infection. The interactions between the SP and other factors from the environment at the level of the FRT should be taken into consideration to develop new preventive strategies against STI such as CT.

Perspectives

To better characterize the mechanisms of SP inhibition of CT infection, several experiments are currently being carried out and could be added to the final manuscript before submission.

Firstly, the transcriptional analysis of CT infected A2EN with or without SP will be assessed by sequencing of amplified cDNA (and not by direct cDNA sequencing as presented in this version of the manuscript) to increase the number of reads and thus the number of differentially regulated genes in the various conditions. We will increase the percentage of infected cells as well as the time post-infection (48h instead of 24h) to increase the number of differentially expressed genes and the detection of bacterial genes.

Secondly, the effect of the pool of SP is tested on a modified strain of CT, expressing a reporter gene (mCherry), and with modified properties compared to the wild-type strain (increased infectivity). We will assess if the pool of SP is also a potent inhibitor of this modified CT strain.

Lastly, we will test the effect of individual SP on CT infection of A2EN cells and on their subsequent cytokine production. In particular, we will characterize the SP from various donors and will assess if there are correlations between their cytokine profile (mildly or highly inflammatory), and their impact on CT infection and/or cytokine production by A2EN cells. For that, we already have collected the SP from about 30 individual donors, we will characterize them in term of cytokine production, and we will test their impact on CT infection of A2EN cells and on the epithelial cell response to the infection.

Acknowledgments

The authors would like to thank L2I team (Julie Morin, Laetitia Bossevot) in the IDMIT department for their help to perform the multiplex assay for cytokine detection, as well as members of the Life&Soft (Ségolène Diry, Cassandra Gaspar and Léo d'Agata) group for their help to perform the transcriptomic assay. The authors would also like to thank Dr Frank Follmann (SSI, Denmark) for kindly providing the CT strain used for the *in vitro* infection of A2EN cells. The authors would also like to thank Luc de Chaisemartin (UMR 996, Hôpital Bichat, France) and Julien Lemaître (IDMIT department, France) for providing advice concerning the development of the neutrophil functional assays.

The authors thank all the donors who provided samples, AP-HP (Assistance Publique Hôpitaux de Paris) and clinical personnel for obtaining the samples; the Clinical Core of the CRT (Center of Translational Science) of the Institut Pasteur for their help with biomedical regulatory aspects of the project, in particular Anaïs Perilhou.

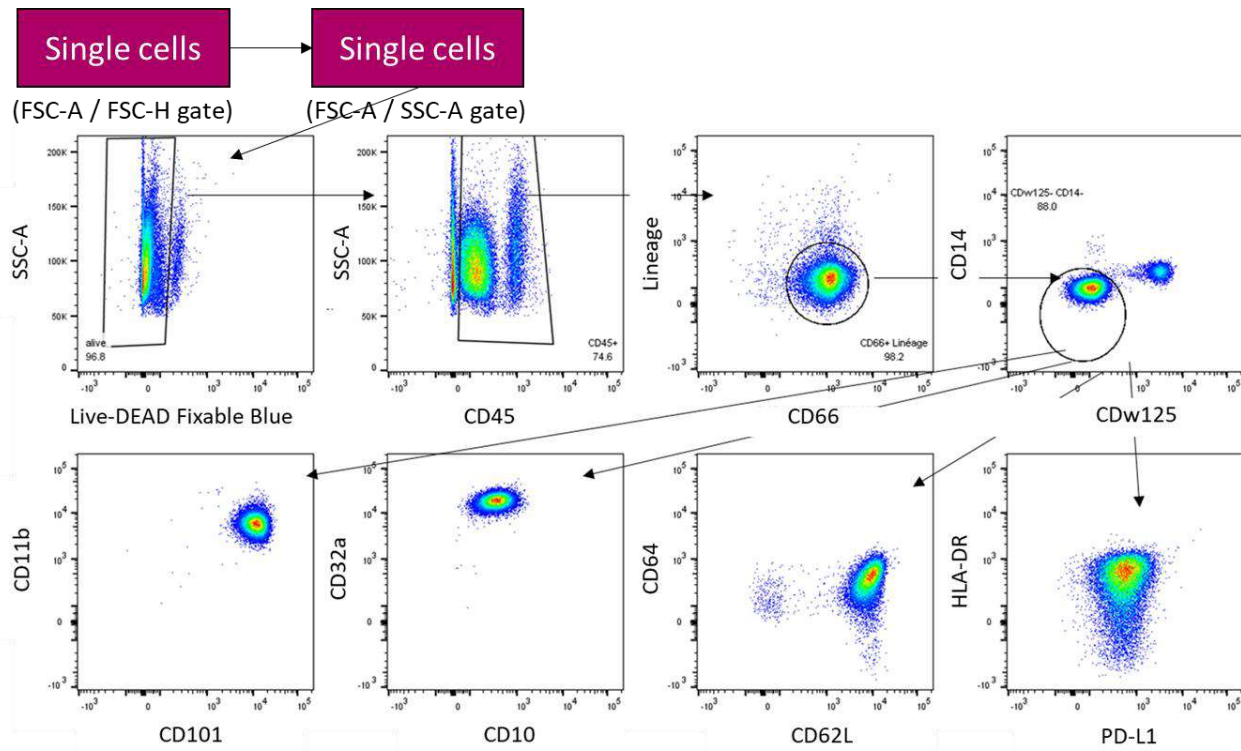
Bibliography

1. Rowley, J. *et al.* Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ* **97**, (2019).
2. Chlamydia infection. <https://www.ecdc.europa.eu/en/chlamydia-infection>.
3. Agrawal, T., Vats, V., Salhan, S. & Mittal, A. The mucosal immune response to Chlamydia trachomatis infection of the reproductive tract in women. *Journal of Reproductive Immunology* **83**, 173–178 (2009).
4. Lu, H., Shen, C. & Brunham, R. C. Chlamydia trachomatis infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18. *J Immunol* **165**, 1463–1469 (2000).
5. Buckner, L. R., Lewis, M. E., Greene, S. J., Foster, T. P. & Quayle, A. J. Chlamydia trachomatis infection results in a modest pro-inflammatory cytokine response and a decrease in T cell chemokine secretion in human polarized endocervical epithelial cells. *Cytokine* **63**, 151–165 (2013).
6. Darville, T. & Hiltke, T. J. Pathogenesis of Genital Tract Disease due to Chlamydia trachomatis. *J Infect Dis* **201**, S114 (2010).
7. Poston, T. B. *et al.* Cervical Cytokines Associated With Chlamydia trachomatis Susceptibility and Protection. *J Infect Dis* **220**, 330–339 (2019).
8. Lijek, R. S., Helble, J. D., Olive, A. J., Seiger, K. W. & Starnbach, M. N. Pathology after Chlamydia trachomatis infection is driven by nonprotective immune cells that are distinct from protective populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 2216–2221 (2018).
9. Lehr, S., Vier, J., Häcker, G. & Kirschnek, S. Activation of neutrophils by Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is modulated by the chlamydial plasmid. *Microbes Infect* **20**, 284–292 (2018).
10. Rajeeve, K., Das, S., Prusty, B. K. & Rudel, T. Chlamydia trachomatis paralyzes neutrophils to evade the host innate immune response. *Nat Microbiol* **3**, 824–835 (2018).
11. Naglak, E. K., Morrison, S. G. & Morrison, R. P. Neutrophils Are Central to Antibody-Mediated Protection against Genital Chlamydia. *Infection and Immunity* **85**, (2017).
12. Schjenken, J. E. *et al.* Sperm modulate uterine immune parameters relevant to embryo implantation and reproductive success in mice. *Communications Biology* **2021 4:1** **4**, 1–14 (2021).
13. Cavarelli, M. & le Grand, R. The importance of semen leukocytes in HIV-1 transmission and the development of prevention strategies. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1765622> 2018–2032 (2020) doi:10.1080/21645515.2020.1765622.
14. Owen, D. H. & Katz, D. F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl* **26**, 459–469 (2005).
15. Song, Z. H. *et al.* Seminal plasma induces inflammation in the uterus through the $\gamma\delta$ T/IL-17 pathway. *Scientific Reports* **2016 6:1** **6**, 1–8 (2016).
16. Katila, T. Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod Domest Anim* **47 Suppl 5**, 31–41 (2012).
17. Adefuye, A., Katz, A. A. & Sales, K. J. The regulation of inflammatory pathways and infectious disease of the cervix by seminal fluid. *Patholog Res Int* **2014**, (2014).
18. Abdulhaqq, S. A. *et al.* Repeated semen exposure decreases cervicovaginal SIVmac251 infection in rhesus macaques. *Nature Communications* **2019 10:1** **10**, 1–10 (2019).

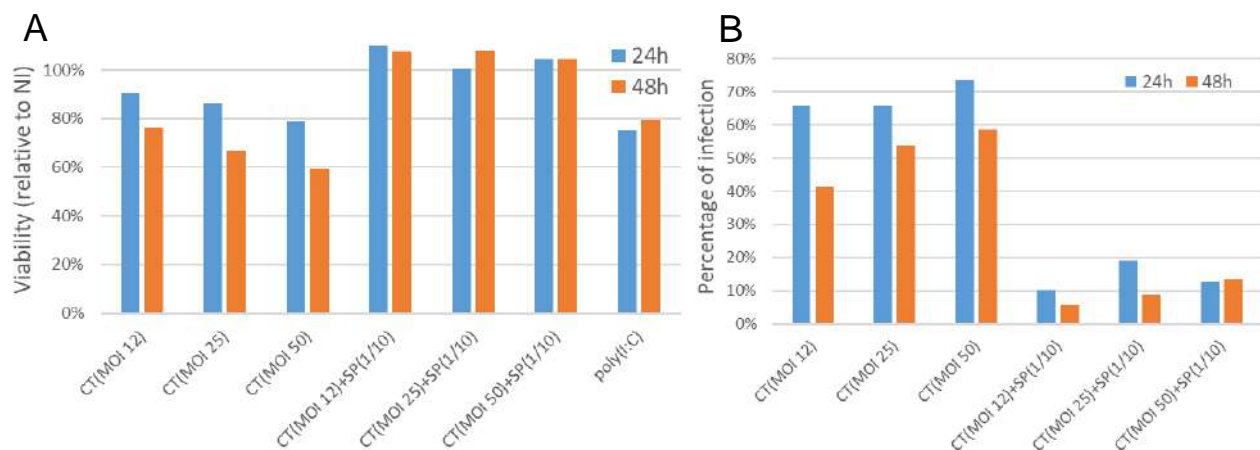
19. Edström, A. M. L. *et al.* The Major Bactericidal Activity of Human Seminal Plasma Is Zinc-Dependent and Derived from Fragmentation of the Semenogelins. *J Immunol* **181**, 3413 (2008).
20. Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A., Calvete, J. J., Peña Vega, F. J. & Roca, J. Seminal Plasma: Relevant for Fertility? *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
21. Herbst-Kralovetz, M. M. *et al.* Quantification and comparison of toll-like receptor expression and responsiveness in primary and immortalized human female lower genital tract epithelia. *Am J Reprod Immunol* **59**, 212–224 (2008).
22. Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A. & Kingsford, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods* **14**, 417–419 (2017).
23. Love, H. C., Timms, D. L., Nestler, F., Frazier, O. H. & Cohn, W. E. A mock circulatory loop for designing and evaluating total artificial hearts. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* **2014**, 5667–5670 (2014).
24. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 1–14 (2013).
25. Xie, Z. *et al.* Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr Protoc* **1**, (2021).
26. Huang, R. *et al.* The NCATS BioPlanet - An Integrated Platform for Exploring the Universe of Cellular Signaling Pathways for Toxicology, Systems Biology, and Chemical Genomics. *Front Pharmacol* **10**, (2019).
27. Sharkey, D. J., Tremellen, K. P., Briggs, N. E., Dekker, G. A. & Robertson, S. A. Seminal plasma transforming growth factor- β , activin A and follistatin fluctuate within men over time. *Hum Reprod* **31**, 2183–2191 (2016).
28. Sharkey, D. J., Macpherson, A. M., Tremellen, K. P. & Robertson, S. A. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod* **13**, 491–501 (2007).
29. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* **13**, 159–175 (2013).
30. Passmore, J. A. S., Jaspán, H. B. & Masson, L. Genital inflammation, immune activation and risk of sexual HIV acquisition. *Curr Opin HIV AIDS* **11**, 156 (2016).
31. Anderson, D. J. & Politch, J. A. Role of Seminal Plasma in Human Female Reproductive Failure: Immunomodulation, Inflammation, and Infections. *Adv Exp Med Biol* **868**, 159–169 (2015).
32. Elwell, C., Mirrashidi, K. & Engel, J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **14**, 385–400 (2016).
33. Buckner, L. R. *et al.* Innate immune mediator profiles and their regulation in a novel polarized immortalized epithelial cell model derived from human endocervix. *J Reprod Immunol* **92**, 8–20 (2011).
34. Sharkey, D. J. *et al.* TGF- β mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. *J Immunol* **189**, 1024–1035 (2012).
35. Schjenken, J. E. & Robertson, S. A. The female response to seminal fluid. *Physiological Reviews* **100**, 1077–1117 (2020).
36. Ng, L. G., Ostuni, R. & Hidalgo, A. Heterogeneity of neutrophils. *Nature Reviews Immunology* **19**, 255–265 (2019).
37. Gasson, J. C. Molecular Physiology of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* **77**, 1131–1145 (1991).

38. Kamp, V. M. *et al.* Modulation of granulocyte kinetics by GM-CSF/IFN- γ in a human LPS rechallenge model. *J Leukoc Biol* **94**, 513–520 (2013).
39. Momose, T. *et al.* Interferon-gamma increases CD62L expression on human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* **120 Suppl 1**, 30–33 (1999).
40. Daniels, R. H., Finnen, M. J., Hill, M. E. & Lackie, J. M. Recombinant human monocyte IL-8 primes NADPH-oxidase and phospholipase A2 activation in human neutrophils. *Immunology* **75**, 157 (1992).
41. Mol, S. *et al.* Efficient Neutrophil Activation Requires Two Simultaneous Activating Stimuli. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 10106 **22**, 10106 (2021).

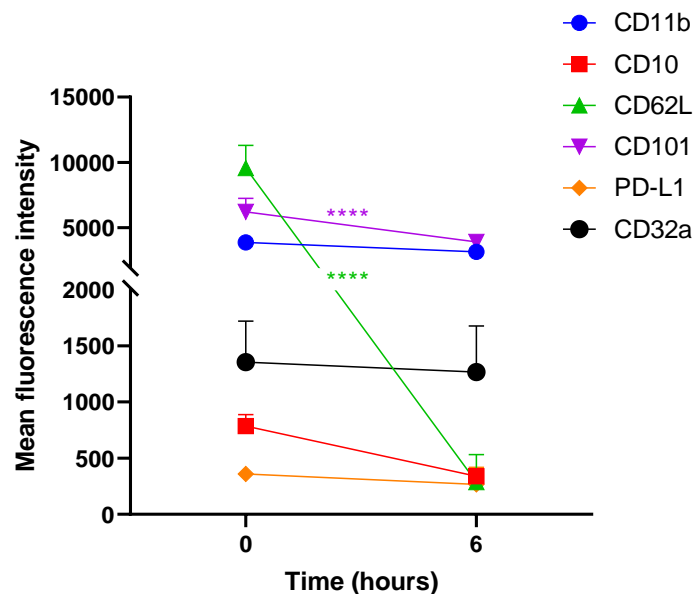
Supplementary Figures



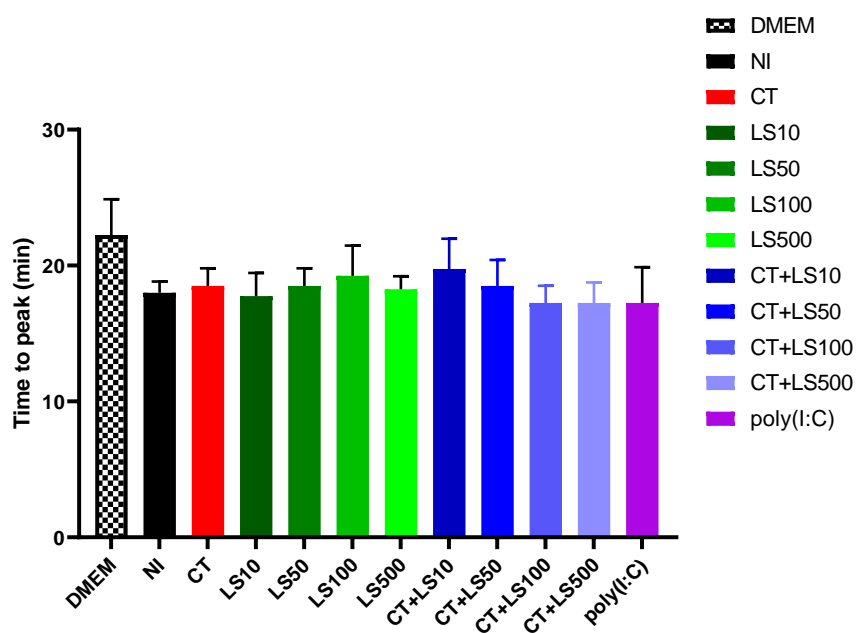
Supplementary Figure 1: FACS gating strategy used for blood neutrophil phenotyping. Neutrophils were defined as CD45⁺, CD66⁺, Lin (CD3,CD8,CD20,CD123)⁻, CD14⁻, CDw125⁻ cells. The mean fluorescence intensity (MFI) of CD11b, CD101, CD10, CD32a, CD62L and PD-L1 was then determined. The MFI of CD64 and HLA-DR were very low and did not vary throughout the study.



Supplementary Figure 2: Impact of SP on CT infection at different MOI. A2EN cells were infected with CT at a MOI of 12, 25 or 50 for 24h or 48h (n=1). (A) A2EN viability was evaluated using CellTiter. (B) The percentage of infection was determined by quantification of the CT inclusion in A2EN infected cells by immunofluorescence staining.



Supplementary Figure 3: Variation of the MFI of neutrophil markers. Neutrophils were isolated from human blood and cultured in DMEM+RPMI for 6h (n=4). Their phenotype was studied after 0h and 6h of incubation, using the antibodies listed in Table 1. The mean fluorescence intensity of CD11b, CD32a, CD10, CD101, CD62L and PD-L1 was analyzed in neutrophils. Asterisks indicate a significant difference by one-way ANOVA test (****p ≤ 0.0001).



Supplementary Figure 4: Impact of A2EN supernatants on blood neutrophil ROS production. A2EN cells were infected or not with CT at a MOI of 12 in presence or not of different dilutions of LS (n=4). After 24h, the supernatants were collected and used on neutrophils isolated from the blood. After 2h of incubation, PMA was added and ROS production was evaluated for 90min by monitoring luminescence emitted by oxidized luminol. The peak of ROS production is shown here.

2 CARACTERISATION DE L'INFLAMMATION GENITALE ET SYSTEMIQUE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE *IN VIVO*.

2.1 Introduction et Objectifs

Au cours de l'étude décrite précédemment, nous avons mis en évidence *in vitro* l'importance de l'environnement muqueux sur l'inflammation au niveau local. L'environnement du TRF est composé de nombreux facteurs capables de contrôler l'inflammation locale et la colonisation par des micro-organismes, pathogènes ou non. Par exemple, le microbiote vaginal a une influence sur la production de cytokines inflammatoires au niveau du TRF et impacte également la susceptibilité aux infections telles que le VIH-1 ou *Chlamydia trachomatis*^{470,471}. Les différents facteurs de l'environnement du TRF : médiateurs solubles (cytokines/chimiokines ou peptides antimicrobiens), les cellules immunitaires ou encore le microbiote vaginal, sont soumis à des fluctuations au cours du cycle menstruel^{9,183}. Les neutrophiles sont présents au niveau du TRF et sont parmi les premières cellules recrutées au site inflammatoire à la suite d'une infection¹¹⁰. Cependant, ils sont très peu étudiés *in vivo* au niveau des muqueuses du TRF, que ce soit en termes de phénotype ou de fonction. Par exemple, il y a très peu de données concernant leurs interactions avec le microbiote vaginal. Les femelles macaques cynomolgus sont un modèle pertinent pour les études physiologiques et pathologiques au niveau du TRF de par leurs nombreuses similitudes avec les femmes⁴⁵⁸. Au sein de notre équipe, nous avons pu décrire leur microbiote vaginal : il est diversifié et sa composition est comparable à celle des femmes possédant un microbiote vaginal dysbiotique. Par ailleurs, comme chez les femmes, la composition du microbiote vaginal des femelles macaques cynomolgus varie en fonction des sécrétions hormonales. Dans la continuité de cette étude⁴⁶⁴, l'objectif de ce projet était d'évaluer les conséquences des variations hormonales sur l'environnement local et systémique. Nous avons donc analysé en parallèle la composition du microbiote vaginal, les populations de neutrophiles et les profils cytokines/chimiokines au niveau local et systémique chez neuf macaques cynomolgus femelles au cours de trois cycles menstruels. Au cours de cette étude, plusieurs échantillons ont été prélevés une fois par semaine : des fluides et des écouvillons cervico-vaginaux, ainsi que des cytobrosses pour suivre respectivement l'évolution de la

concentration en facteurs solubles, la composition du microbiote vaginal et le phénotype des neutrophiles.

2.2 Résultats

Les concentrations de cytokines varient en fonction des compartiments étudiés (sang ou fluides cervico-vaginaux). Au cours du cycle menstruel, plusieurs médiateurs de l'inflammation varient au niveau local, mais pas au niveau systémique. Un pic d'expression de plusieurs facteurs solubles est observé lors des menstruations. Les sous-populations de neutrophiles varient également en fonction des compartiments étudiés : dans le sang, on observe une population majoritairement mature et activée correspondant à un phénotype $CD10^+ CD101^+ CD11b^+ CD32a^+ CD62L^+$. En revanche, au niveau des cytobrosses vaginales, trois populations peuvent être présentes, correspondant respectivement à un phénotype $CD11b^{high} CD101^+ CD10^+ CD32a^+$, $CD11b^{high} CD101^+ CD10^- CD32a^+$ ou $CD11b^{low} CD101^- CD10^- CD32^-$. Toutes ces populations présentent une faible expression de CD62L. Au cours des menstruations, la fréquence d'une sous-population $CD11b^{high} CD101^+ CD10^+ CD32a^+ CD62L^+$ est fortement augmentée, correspondant à un phénotype de neutrophiles matures et activés. Le niveau élevé de CD62L sur cette sous-population nous amène à faire l'hypothèse qu'elle provient du compartiment sanguin, car l'expression de CD62L est généralement diminuée après la migration des neutrophiles dans les tissus. Concernant le microbiote vaginal, trois phylums principaux ont été observés : *Firmicutes*, *Bacteroidota* et *Actinobacteriota*. La composition du microbiote vaginal varie en fonction du cycle menstruel, avec une abondance différentielle de 10 familles bactériennes en fonction du taux progestérone. Lors des menstruations, la diversité microbienne augmente et d'autres familles bactériennes sont différentiellement exprimées.

Par la suite, nous avons analysé de manière non supervisée l'ensemble de ces données. Grâce à un regroupement hiérarchique, nous avons pu observer que les données correspondant aux menstruations se regroupaient et que lors de cette phase du cycle menstruel, différents facteurs de l'environnement du TRF (cytokines, neutrophiles) présentaient un profil pro-inflammatoire. Par ailleurs, le regroupement hiérarchique a mis en évidence que les timepoints de certains animaux se regroupaient également entre eux. Cela montre une forte

variabilité interindividuelle des données collectées au niveau du TRF.

Pour conclure, cette étude propose pour la première fois une caractérisation phénotypique des sous-populations de neutrophiles au niveau vaginal. Elle souligne le besoin d'études longitudinales dans les expériences incluant des animaux femelles. En effet, le cycle menstruel a un impact sur les facteurs de l'environnement du TRF, et un calendrier d'échantillonnage pertinent est nécessaire pour éviter des biais d'interprétation. De plus, le moment du cycle menstruel est important à prendre en considération lors d'interventions expérimentales locales au niveau du TRF : infections, microbicides, études de molécules à potentiel thérapeutique, ...

2.3 Article 2

« Local Innate Markers and Vaginal Microbiota Composition Are Influenced by
Hormonal Cycle Phases »

Article publié dans *Frontiers in Immunology*.
13:841723.doi: 10.3389/fimmu.2022.841723



Local Innate Markers and Vaginal Microbiota Composition Are Influenced by Hormonal Cycle Phases

Cindy Adapen¹, Louis Réot¹, Natalia Nunez², Claude Cannou^{1,3}, Romain Marlin¹, Julien Lemaître¹, Léo d'Agata², Emmanuel Gilson², Eric Ginoux², Roger Le Grand¹, Marie-Thérèse Nugeyre^{1,3} and Elisabeth Menu^{1,3*}

¹ Université Paris-Saclay, Inserm, Commissariat à l'énergie Atomique et aux énergies Alternatives (CEA), Center for Immunology of Viral, Auto-Immune, Hematological and Bacterial Diseases [IMVA-HB/Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT)], Fontenay-aux-Roses, France, ² Life&Soft, Fontenay-aux-Roses, France, ³ Mucosal Immunity and Sexually Transmitted Infection Control (MISTIC) Group, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Damián Muzzio,
University of Greifswald, Germany

Reviewed by:

Toby K. Eisenstein,
Temple University, United States
Jocelyn M. Wessels,
McMaster University, Canada

*Correspondence:

Elisabeth Menu
Elisabeth.menu@cea.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 22 December 2021

Accepted: 28 February 2022

Published: 25 March 2022

Citation:

Adapen C, Réot L, Nunez N, Cannou C, Marlin R, Lemaître J, d'Agata L, Gilson E, Ginoux E, Le Grand R, Nugeyre M-T and Menu E (2022) Local Innate Markers and Vaginal Microbiota Composition Are Influenced by Hormonal Cycle Phases. *Front. Immunol.* 13:841723. doi: 10.3389/fimmu.2022.841723

Background: The female reproductive tract (FRT) mucosa is the first line of defense against sexually transmitted infection (STI). FRT environmental factors, including immune-cell composition and the vaginal microbiota, interact with each other to modulate susceptibility to STIs. Moreover, the menstrual cycle induces important modifications within the FRT mucosa. Cynomolgus macaques are used as a model for the pathogenesis and prophylaxis of STIs. In addition, their menstrual cycle and FRT morphology are similar to women. The cynomolgus macaque vaginal microbiota is highly diverse and similar to dysbiotic vaginal microbiota observed in women. However, the impact of the menstrual cycle on immune markers and the vaginal microbiota in female cynomolgus macaques is unknown. We conducted a longitudinal study covering three menstrual cycles in cynomolgus macaques. The evolution of the composition of the vaginal microbiota and inflammation (cytokine/chemokine profile and neutrophil phenotype) in the FRT and blood was determined throughout the menstrual cycle.

Results: Cervicovaginal cytokine/chemokine concentrations were affected by the menstrual cycle, with a peak of production during menstruation. We observed three main cervicovaginal neutrophil subpopulations: CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁺ CD32a⁺, CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁻ CD32a⁺, and CD11b^{low} CD101^{low} CD10⁻ CD32a⁻, of which the proportion varied during the menstrual cycle. During menstruation, there was an increase in the CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁺ CD32a⁺ subset of neutrophils, which expressed higher levels of CD62L. Various bacterial taxa in the vaginal microbiota showed differential abundance depending on the phase of the menstrual cycle. Compilation of the factors that vary according to hormonal phase showed the clustering of samples collected during menstruation, characterized by a high concentration of cytokines and an elevated abundance of the CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁺ CD32a⁺ CD62L⁺ neutrophil subpopulation.

Conclusions: We show a significant impact of menstruation on the local environment (cytokine production, neutrophil phenotype, and vaginal microbiota composition) in female cynomolgus macaques. Menstruation triggers increased production of cytokines, shift of the vaginal microbiota composition and the recruitment of mature/activated neutrophils from the blood to the FRT. These results support the need to monitor the menstrual cycle and a longitudinal sampling schedule for further studies in female animals and/or women focusing on the mucosal FRT environment.

Keywords: inflammation, menstrual cycle, female reproductive tract (FRT), cytokines, blood compartment, neutrophils, vaginal microbiota

1 INTRODUCTION

Heterosexual transmission from males to females is among the major routes of sexually transmitted infections (STIs) and occurs mainly through the female reproductive tract (FRT). The FRT is composed of a wide array of environmental factors, such as a mucus layer, secreted IgA/IgG, vaginal microbiota, local immune cells, an epithelium barrier, and soluble factors, such as antimicrobial peptides, cytokines, and chemokines (1). These factors all interact with each other to modulate susceptibility to pathogen invasion. They are affected by hormonal variations, which are involved in modifying the composition of the vaginal microbiota and the regulation of innate and adaptive immune responses within the FRT and peripheral blood (1–4). The menstrual cycle in women is composed of four phases: menstruation and the follicular phase (i.e., proliferative phase), ovulation phase, and luteal phase (i.e., secretory phase). Two main groups of hormones regulate the menstrual cycle: pituitary hormones (including follicle stimulating and luteinizing hormones) and ovarian hormones (including estradiol and progesterone). Menstrual bleeding is induced by a drop in progesterone and estradiol concentrations triggered by the absence of fertilization. It is followed by the proliferative phase, characterized by an increase in the production of estradiol by mature follicles in the ovary. The estradiol concentration peaks one to two days before ovulation. Subsequently, the secretory phase begins, characterized by increased production of progesterone (5). Hormone production has been shown to induce compositional changes in the vaginal microbiota in women. At puberty, increased levels of estradiol dramatically alter the vaginal microbiota, at which time it shifts from a diverse microbiota, rich in anaerobic bacteria, to a *Lactobacillus* species (*spp.*) dominant microbiota (6, 7). Exogenous hormone treatments (injectable progestin, combined oral contraceptives...) also modified bacterial diversity (8–10). In addition, the composition of the vaginal microbiota has also been shown to influence local immune responses. Indeed, a *Lactobacillus* spp. dominated microbiota (Community state type (CST) I, II, V) induces low inflammation and a lower susceptibility to STI acquisition (11, 12). On the contrary, a diverse microbiota composed of anaerobic bacteria, such as *Prevotella*, *Dialister*, *Atopium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, and *Mobiluncus*, with a low abundance of *Lactobacillus* spp.

(CST-IV) has been linked to increased local inflammation. This clinical condition is called bacterial vaginosis (BV). This type of inflammation is mediated by increased expression of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-8, IL-12, IL-18, TNF α , and IFN γ and a higher frequency of activated CD4⁺ T cells and Th17 cells (13). Very little is known about the relationship between neutrophils and the vaginal microbiota. Neutrophils are essential in antimicrobial immunity but a sustained presence of neutrophils within the vagina may lead to tissue damage and inflammation, as seen in several STIs (14, 15). More information is available on the interaction between the gut microbiota and neutrophils. The gut microbiota is essential for neutrophil production and priming and, in return, neutrophils are essential for containment of the microbiota (16–18). Hensley et al. showed that an altered ratio of *Lactobacillus/Prevotella* is responsible for the increased survival of neutrophils in colorectal biopsies of HIV-1-infected Antiretroviral treatment (ART)-treated patients (19).

Here, we focused on the characterization of FRT inflammation during the menstrual cycle and the relationship with local changes in the microbiota in cynomolgus macaques used as a model for the study of human STI.

The FRT of cynomolgus macaques is similar to that of women in terms of morphology, the endocrine system, and menstrual cycle, making them an appropriate study model to analyze the effect of hormonal variation on immune markers (20–22). Menstrual cycle length in cynomolgus macaques is between 28 and 32 days (proliferative phase 12–14 days, secretory phase 14–16 days, bleeding 1–8 days) (21, 22). We previously showed that they have a highly diverse vaginal microbiota, composed mainly of anaerobic bacteria, such as *Sneathia*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptoniphilus*, *Bacteroides*, and *Dialister* and a few *Lactobacillus* spp. This composition is similar to that of women belonging to CST IV (23). Similar to women, the abundance of certain bacterial genera within the vaginal microbiota of female macaques is influenced by hormonal changes (23). These variations observed in the FRT may influence the level of local inflammation and subsequently, susceptibility to STIs.

We characterized the modifications of FRT inflammation during the menstrual cycle in a longitudinal study of nine female cynomolgus macaques. Inflammation was evaluated by measuring cytokine/chemokine concentrations and characterizing neutrophil subpopulations in parallel with determining the composition of the vaginal microbiota. Studying the interactions between the vaginal

microbiota and inflammatory markers during the phases of the menstrual cycle is essential to understanding the impact of these factors on susceptibility to STIs and beyond.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental Design and Sample Collection

Nine female cynomolgus macaques were studied for three months. Their age, weight, and haplotype are summarized in **Table 1**. Sample collection was performed once a week for 12 weeks, representing approximately three menstrual cycles. The experimental design is summarized in **Figure 1A**. The order of sampling was as follows: Weck-Cel Spear during blood withdrawal, cervicovaginal swabs, and cervicovaginal cytobrushes. Cervicovaginal fluids were collected with a Weck-Cel Spear (Medtronic) placed in the vaginal vault for 2 min. Secretions were recovered from the spears by adding 600 μ L elution buffer (PBS, 0.25 M NaCl, and protease inhibitor mix; Merck Millipore, Fontenay-sous-Bois, France) and centrifuged at 13,000 \times g for 20 min. Secretions were then aliquoted and stored at -80°C before cytokine/chemokine quantification. Blood was collected and used for complete blood counts (CBCs) and the plasma collected, aliquoted, and stored at -80°C for cytokine and progesterone quantification. Vaginal samples for microbiota analysis were collected using nylon flocked swabs with 1 mL of liquid amies (ESwabR1, Copan Diagnostics Inc., Murrieta, CA, USA) inserted into the vaginal vault and turned 4 to 5 times before storing in liquid amies. Swabs were then aliquoted and either used for calculation of the Nugent score or stored frozen at -80°C until DNA extraction. Room control samples (air swabs) were performed at the last time point. Cervicovaginal cells were collected using two successive cytobrushes (VWR; Belgium) inserted into the vaginal cavity and turned 4 to 5 times. After collection, the cytobrushes were placed in a 15-mL tube containing 5 mL RPMI with 10% fetal calf serum (FCS) (PAA The cell culture company, ref A15-102, lot: A10210-2737) and

5% penicillin/streptomycin/neomycin (PSN). The samples were kept on ice before processing.

2.2 Progesterone Quantification

The progesterone level was determined in peripheral blood plasma samples each week by ELISA (IBL international; Germany) according to the manufacturer's instructions (**Figure 1B**). Progesterone groups were determined as follows: high progesterone (>1.4 ng/mL), low progesterone (<1.4 ng/mL), and menstruation (bleeding and/or low progesterone level after a peak of progesterone). We estimated the displacement between the menstrual cycle of the animals (through progesterone levels) using the popular methodology for time series alignment: cross-correlation maximum. Computations were carried out using the Python package SciPy (24). The optimal lag is derived as the one that maximizes the cross-correlation, which is a similarity measure between time-series as a function of the lag.

2.3 Cytokine and Chemokine Quantification

Pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as chemokines, were quantified in cervicovaginal fluids and plasma using a 23plex assay for the detection of G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23(p40), IL-13, IL-15, IL-17A, CCL2, CCL3, CCL4, sCD40L, TGF α , TNF α , VEGF, and IL-18 (NHP cytokine magnetic bead panel kit; Merck Millipore; Germany), according to the manufacturer's instructions.

2.4 Cytospin and Blood Smears

Cytospin was performed at each timepoint on a cervicovaginal cell suspension. Briefly, between 10^4 and 10^5 cells were seeded and centrifuged at 72 \times g for 1 min. Whole blood smears were also performed for each timepoint. Dry cytopins and whole blood smears were then fixed with Labofix Q path (VWR Avantor; Belgium) and May-Grunwald Giemsa staining performed (RAL diagnostics; France). Slides were observed using an Eclipse 80i microscope (NIKON). Images were

TABLE 1 | Information on the nine female cynomolgus macaques included in the study.

Animal	Date of birth	Age (years)	Weight (mean kg \pm SD)	Haplotype
MF1	2011-11-24	8.6	6.62 \pm 0.06	H6
MF2	2011-12-27	8.5	4.62 \pm 0.08	H6 H5 H3
MF3	2011-12-26	8.5	3.80 \pm 0.12	Rec H2H5 Rec H3H1
MF4	2010-11-05	9.6	5.42 \pm 0.05	H1 H1
MF5	2010-11-16	9.6	4.05 \pm 0.10	H2 H1
MF6	2012-02-05	8.3	3.76 \pm 0.14	H1 Rec-H1H5H3
MF7	2012-12-02	7.6	6.49 \pm 0.09	H3 H1
MF8	2013-01-19	7.4	5.29 \pm 0.12	Rec H6-H11 Rec H2-H6
MF9	2013-02-05	7.4	5.90 \pm 0.07	Rec H3-H2 Rec H5-H2

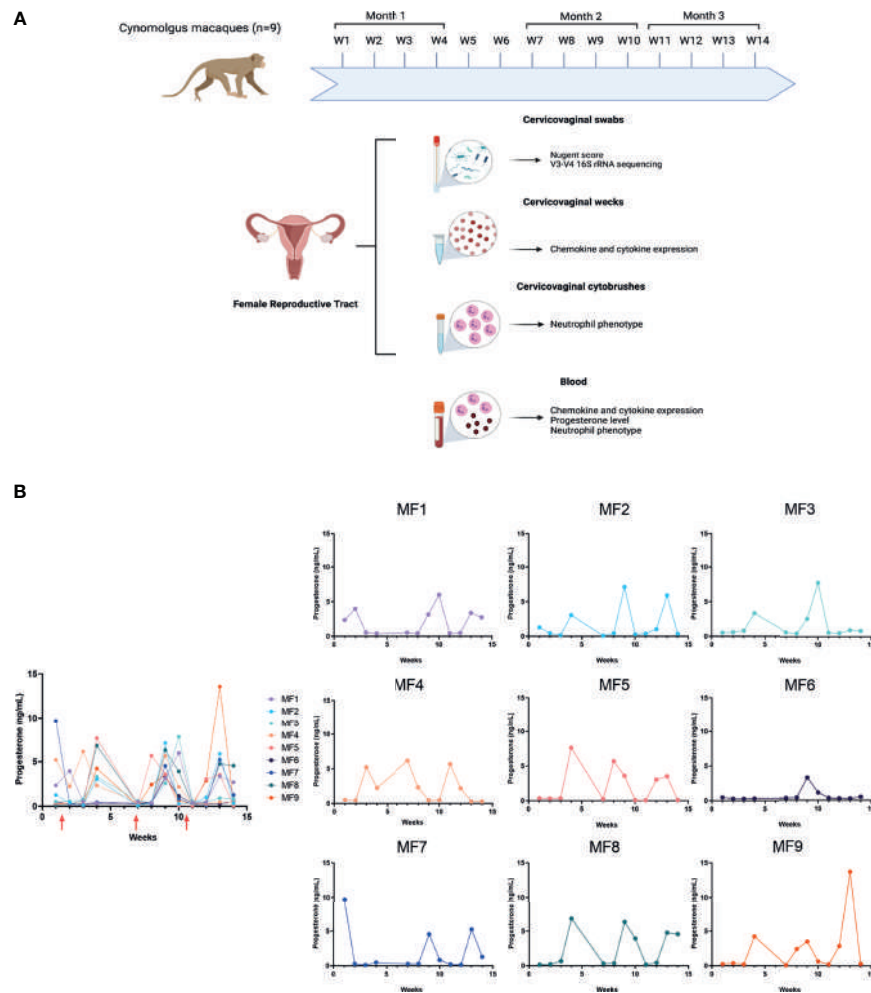


FIGURE 1 | Experimental design and progesterone level. **(A)** Nine female cynomolgus macaques were included in the study. Blood, cervicovaginal fluids (Weck-cel[®]) and swabs, as well as cervicovaginal cells, were collected once a week for three months. Samples were not collected during weeks 5 and 6. Image created in BioRender.com. **(B)** Progesterone concentrations were quantified in plasma once a week for all individuals. The graphical representation of progesterone concentration including all animals was obtained using interpolated and aligned data (left). On the contrary, the graphical representation of progesterone concentration for each individual was obtained using the raw data (right). Red arrows represent menstruation.

acquired with a 60X objective using a high-definition cooled color digital camera (DXM1200C; NIKON).

2.5 Neutrophil Phenotyping

Neutrophil populations were analyzed in whole blood and cervicovaginal cells. Cervicovaginal cells were filtered using a 35 μm filter (Corning Falcon; USA). Then, cervicovaginal cells and whole blood were incubated with the antibodies listed in **Table 2**, washed, and fixed with FACS lysing buffer (BD, Biosciences) or BD cell Fix solution (BD, Biosciences). A 14-color panel containing neutrophil maturation and activation surface markers was used. Phenotyping was performed on a Fortessa instrument (BD, Biosciences) using DIVA (BD) and FlowJo (Tristar, USA) software. The gating strategy for cervicovaginal cytobrushes is described in **Supplementary Figure 1**.

2.6 Nugent Score Determination

Vaginal fluids obtained by swabbing were spread on a slide and fixed with heat (50°C) and 100% ethanol before Gram staining (RAL diagnostics; France). Slides were then observed with a 100X oil immersion lens using an Axioplan 2 microscope (Zeiss). Gram-positive rod-shaped bacteria, as well as non-rod-shaped bacteria, were counted in 10 random fields for each slide. The Nugent score was determined by adding the score of non-rod- and rod-shaped bacteria (**Table 3**). In women, a score from 7 to 10 indicates bacterial vaginosis, from 4 to 6 intermediate flora, and 0 to 3 normal flora (25).

2.7 DNA Extraction and 16S rRNA Gene Sequencing

DNA from vaginal fluids was extracted using the PowerFecal DNA Pro isolation kit (Qiagen; Germany) following the

TABLE 2 | Antibodies used to characterize the neutrophil subpopulations.

Antibody	Clones	Label	Vol per test (~10 ⁶ cells) or concentration	Reference	Manufacturer
Bluevid		BUV736	1X	L23105	Lifetechnologies
CD64	10.1	BUV737	3 µL	612776	BD
CD11b	REA713	FITC	2 µL	130-110-552	Milteny
CD45	REA599	Viogreen	2 µL	130-177-193	Milteny
CD3	SP34.2	BV650	2 µL	563916	BD
CD8	RPAT8	BV650	2 µL	563821	BD
CD20	2H7	BV650	2 µL	563780	BD
CD123	7G3	BV650	5 µL	563405	BD
CD62L	SK11	BV711	2 µL	565040	BD
CD14	REA599	Vioblue	2 µL	130-110-524	Milteny
CD10	HI10a	PercP-Cy5,5	5 µL	312216	Biolegend
CDw125	REA705	PE	2.5 µL	130-110-544	Milteny
PD-L1	29E.2A3	PE-Dazzle594	3 µL	329732	Biolegend
CD101	REA954	PE-Vio770	2 µL	130-115-832	Milteny
CD32a	IV.3	AF647	0.5 mg/mL	60012	Stemcell
HLA-DR	L234	AF700	1 µL	307626	Biolegend
CD66	TET2	APC-Vio770	2 µL	130-119-847	Milteny

manufacturer's instructions. DNA was quantified on a Qubit 4 fluorimeter using the high sensitivity DNA kit (Life Technologies; USA). PCR and sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene was performed at the @BRIDGE platform (GABI, INRA, AgroParisTech, Paris-Saclay University). The V3-V4 hyper-variable regions of the 16S rRNA gene were amplified from the DNA extracts during the first PCR step using the universal primers 5' CTTTCCTACACGACGCTCTTCGGATCTACGGRAGGCAGCAG and 5' GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT, which are fusion primers (26). The PCR reaction was carried out using a T100 thermal cycler (Biorad, USA) as follows: an initial denaturation step (94°C 10 min) was followed by 30 cycles of amplification (94°C for 1 min, 68°C for 1 min, and 72°C for 1 min) and a final elongation step at 72°C for 10 min. Sample multiplexing was performed by adding tailor-made 6-bp unique indexes during the second PCR step at the same time as the second part of the P5/P7 adapters to obtain primers 5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT-CTTTCCTACACGAC and reverse primer 5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-NNNNNN-GTGACT-GGAGTTCAGACGTGT. The PCR reaction was carried out using a T100 thermal cycler with an initial denaturation step (94°C for 10 min), 12 cycles of amplification (94°C for 1 min, 65°C for 1 min and 72°C for 1 min), and a final elongation step at 72°C for 10 min. All libraries were pooled using equal amounts to generate an equivalent number of raw reads for each library. The pool, at a final concentration of 5 to 20 nM, was used for sequencing. The PhiX Control v3 (Illumina,

USA) was added to the pool at 15% of the final concentration, as described in the Illumina procedure. Then, 600 µl of this pool and PhiX mixture was loaded onto an Illumina MiSeq cartridge according to the manufacturer's instructions using the MiSeq Reagent Kit v3. FastQ files were generated at the end of the run (MiSeq Reporter software, Illumina, USA) to perform the quality control. The quality of the run was checked internally using the PhiX Control and then each paired-end sequence was assigned to its sample using the multiplexing index.

2.8 Sequencing Data Processing and Taxonomic Assignment

Illumina sequences were processed using the FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) (27). Bacterial 16S rRNA paired-end reads were merged with a 0.1 maximum rate of mismatch in the overlap region using Vsearch (28). Each of the samples was from a unique timepoint. Thus, after dereplication, the clustering step was run with an aggregation distance equal to 1 (maximum number of differences between each of our sequences) and denoising was not required. Chimeras were also removed using Vsearch. More than 93% of the total sequence abundance was retained. Sequences were then filtered to keep at least 0.0005% of all sequences and the phiX databank was equally applied to eliminate Illumina contaminants. Finally, taxonomic affiliation was performed using the SILVA 138 pintail 100 database. Alpha diversity was calculated using the Shannon diversity index. Beta diversity was calculated using the weighted UniFrac distance method.

TABLE 3 | Nugent score determination in women.

Score	<i>Lactobacillus</i> (number of bacteria/field)	Anaerobic bacteria (number of bacteria/field)	<i>Mobiluncus</i> (number of bacteria/field)
0	>30	0	0
1	5 to 30	<1	<1 to 4
2	1 to 4	1 to 4	5 to >30
3	<1	5 to 30	
4	0	>30	

2.9 Statistical Analysis

Heatmaps representing fold changes of cytokine concentrations in cervicovaginal fluids or peripheral blood plasma were obtained using Tableau software (Seattle, USA). Ordinary one-way ANOVA was used to compare fold changes of cytokine concentrations to the mean total fold change as a reference. GraphPad prism software version 9 for windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, (<http://www.graphpad.com>)) was used for graphical representation of the vaginal microbiota composition (pie-charts), cytokine concentrations, percentage of neutrophil subpopulations, and bacterial abundance according to progesterone level. Significant differences between groups were confirmed using either a paired T-test or Kruskal-Wallis test with p values adjusted using Dunn's test. The MetagenomeSeq fitZIG algorithm (29) was used to determine differentially abundant bacteria according to the menstrual phase. Significant differentially abundant cytokines, neutrophils, and microbiome data were merged into one global heatmap using R (version 4.1.0) with the pheatmap package (version 1.0.12). Data were normalized and the fold change calculated using the mean value for the variable in all samples as the reference. A log₁₀ transformation was applied directly to the fold change to manage extreme values. Samples were clustered using a hierarchical clustering approach available in the pheatmap function. Annotation colors were added to visually assess whether the samples clustered by animal or by progesterone level. Finally, absent measurements in the data were flagged as non-determined (ND) and values with an abundance of zero were colored in grey.

2.10 Ethical Approval

Nine sexually mature adult female cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*), aged 7 to 9 years and originating from Mauritian AAALAC certified breeding centers, were included in this study. All animals were housed in the Infectious Disease Models and Innovative Therapies facilities (IDMIT) at the Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA, Fontenay-aux-roses) under BSL-2 containment (Animal facility authorization #D92-032-02, Préfecture des Hauts de Seine, France) and in compliance with European Directive 2010/63/EU, French regulations, and the Standards for the Humane Care and Use of Laboratory Animals of the Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, assurance number #A5826-01, US). This study was approved and accredited by the institutional ethics committee "Comité d'Ethique en Expérimentation Animale du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives" (CEtEA #44) under statement number A18-083. The study was authorized by the "Research, Innovation and Education Ministry" under registration number APAFIS#20692-2019051709424034v1. The nine animals were housed in two different rooms in social groups of 5/6 animals under controlled conditions of humidity, temperature, and light (12 h light/dark cycles). The animals were fed once or twice a day with commercial monkey chow and fruit. Water was available ad libitum. They were provided with

environmental enrichment, including toys and novel food under the supervision of the CEA Animal Welfare Officer.

3 RESULTS

3.1 Cervicovaginal Cytokines Vary According to Hormonal Phase

We monitored local and systemic inflammation by measuring cytokine and chemokine levels in cervicovaginal fluids and peripheral blood plasma using a multiplex technique.

3.1.1 Peripheral Blood Samples

Cytokines were quantified in the plasma for each female for all timepoints and the mean fold change calculated based on the total mean value represented for cytokines relevant to the study (**Figure 2A**). The concentration of G-CSF, IFN γ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-12/23, CCL2, CCL3, CCL4, sCD40L, TGF α , TNF α , and VEGF varied among the females (**Figure 2A**). For example, monkey MF7 (*Macaca fascicularis* 7) had a higher plasma concentration of IL-2 and IFN γ than the other females, whereas MF1 had a higher plasma concentration of G-CSF, IL-12/23 (p40), and IL-2. The concentration of certain cytokines, such as G-CSF, IL-8, IL12/23 (p40), CCL2, and sCD40L, fluctuated according to time (**Figure 2B**). The samples were then divided into three groups based on progesterone level and clinical observations (high or low progesterone level and menstruation) to further analyze whether the variations were due to the hormonal cycle. There were no significant changes in cytokine concentrations in the plasma due to the hormonal cycle (**Supplementary Figure 2**).

3.1.2 Cervicovaginal Fluids

In parallel to peripheral blood plasma, we studied local inflammation in the cervicovaginal fluids. The 23 cytokines were detected in the vaginal fluids of all nine females at varying concentrations. However, only cytokines relevant to this study were displayed on the heatmap representing the mean fold change in expression relative to the total mean value of each cytokine (**Figure 3A**). MF3 expressed a higher level of TNF α and CCL4 than the other females (**Figure 3A**). The heatmap representing the kinetics of cytokine levels in all animals showed a change in cytokine concentrations with time (**Figure 3B**). Interestingly, there was increased production of several cytokines around or during menstruation. All the samples were divided into three groups based on the phase of the menstrual cycle (high or low progesterone level and menstruation) to confirm the impact of the menstrual cycle on cytokine concentration (**Figure 3C**). The analysis showed the concentration of 12 of 23 cytokines/chemokines (CCL2, G-CSF, TNF α , GM-CSF, IFN γ , VEGF, IL-10, IL-12/23, IL-2, TGF α , IL-6, and sCD40L) to be higher in cervicovaginal fluids during menstruation than during the high-progesterone phase. The concentration of CCL4 and IL-8 was higher during menstruation than during the low-progesterone phase. There were also differences between the low- and

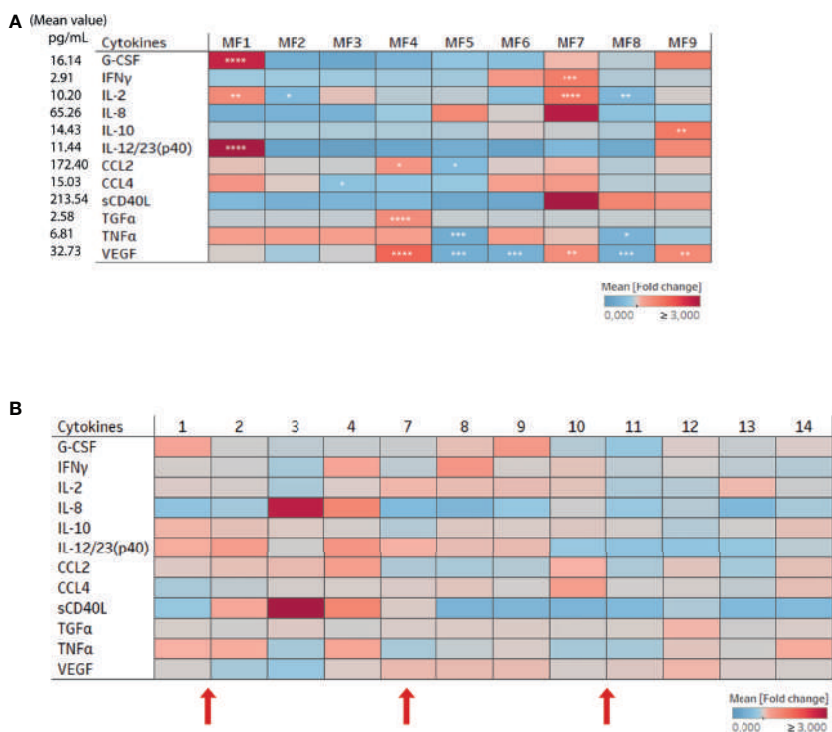


FIGURE 2 | Cytokine and chemokine expression in the plasma of female cynomolgus macaques ($n = 9$). **(A)** Heatmap representing the mean fold change in the expression of cytokines and chemokines in the plasma of each animal ($n = 9$). The fold change was calculated based on the mean expression of each cytokine/chemokine for all females and time points. One way ANOVA was performed to compare the total fold change value to those of each animal for each cytokine. Asterisks indicate p values considered to be statistically significant ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$). **(B)** Heat map representing the mean fold change in the expression of cytokines and chemokines in the plasma for all animals according to time ($n = 9$). The fold change was calculated based on the mean expression of each cytokine/chemokine in each female. Numbers 1 to 14 refers to weeks. Red arrows represent menstruation.

high-progesterone groups. Indeed G-CSF and IL-2 concentrations were higher in the low-progesterone than high-progesterone group and the opposite was observed for IL-8.

We compared the cytokine concentrations between the blood and cervicovaginal fluids to investigate their similarities and differences. The mean production of several cytokines (IL-1 β , IL-1RA, IL-5, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, TGF α , and TNF α), growth factors (GM-CSF, G-CSF), and chemokines (CCL2, CCL3) was higher in the cervicovaginal fluids than peripheral blood plasma for all animals. Only CCL4 was higher in the peripheral blood plasma than cervicovaginal fluids (**Supplementary Figure 3**). Thus, each compartment showed distinct cytokine profiles.

Overall, these results show that the hormonal cycle significantly affects cytokine profiles in cervicovaginal fluids but not the peripheral blood plasma of female cynomolgus macaques.

3.2 Neutrophil Subpopulations in Cervicovaginal Cytobrushes Are Strongly Affected by the Hormonal Phase

We collected vaginal cytobrushes and whole blood and stained the cells with specific cell-surface antibodies before flow cytometry analysis to study the presence and evolution of neutrophil subpopulations in the blood and cervicovaginal

compartments during the menstrual cycle. Neutrophils were identified as CD45 positive Lineage negative (CD3, CD8, CD20, CD123, CD14, CDw125) and CD66abce positive. CD10 and CD101 were used to determine maturity. CD62L shedding and increased CD11b expression were assessed to determine the priming status of blood neutrophils (30). The panel was completed with CD32a, CD64, PD-L1, and HLA-DR to study activation of the neutrophils in the two compartments.

We first analyzed neutrophil populations in the two compartments independently of their variation with time. The percentage of neutrophils among CD45 $^{+}$ cells (Mean \pm SD) was quite similar between vaginal cytobrushes ($77.8\% \pm 8.28$) and blood ($68.3\% \pm 5.08$) in all animals (**Figure 4A**). A punch of vaginal tissue near the cervix was collected and frozen to study the localization of neutrophils within the mucosa. Immunohistochemistry staining was performed using an anti-calprotectin antibody to visualize the neutrophils (**Supplementary Figure 4**), showing the presence of neutrophils underneath the epithelium. This suggests that a portion of the neutrophils collected in cervicovaginal cytobrushes originated from the tissue itself and that another may have come from the lumen. We performed blood smears and cytopspins with the cells collected with the cervicovaginal cytobrushes each week to study the morphology of the neutrophils. As seen on an example of a representative individual, most of the neutrophils in the

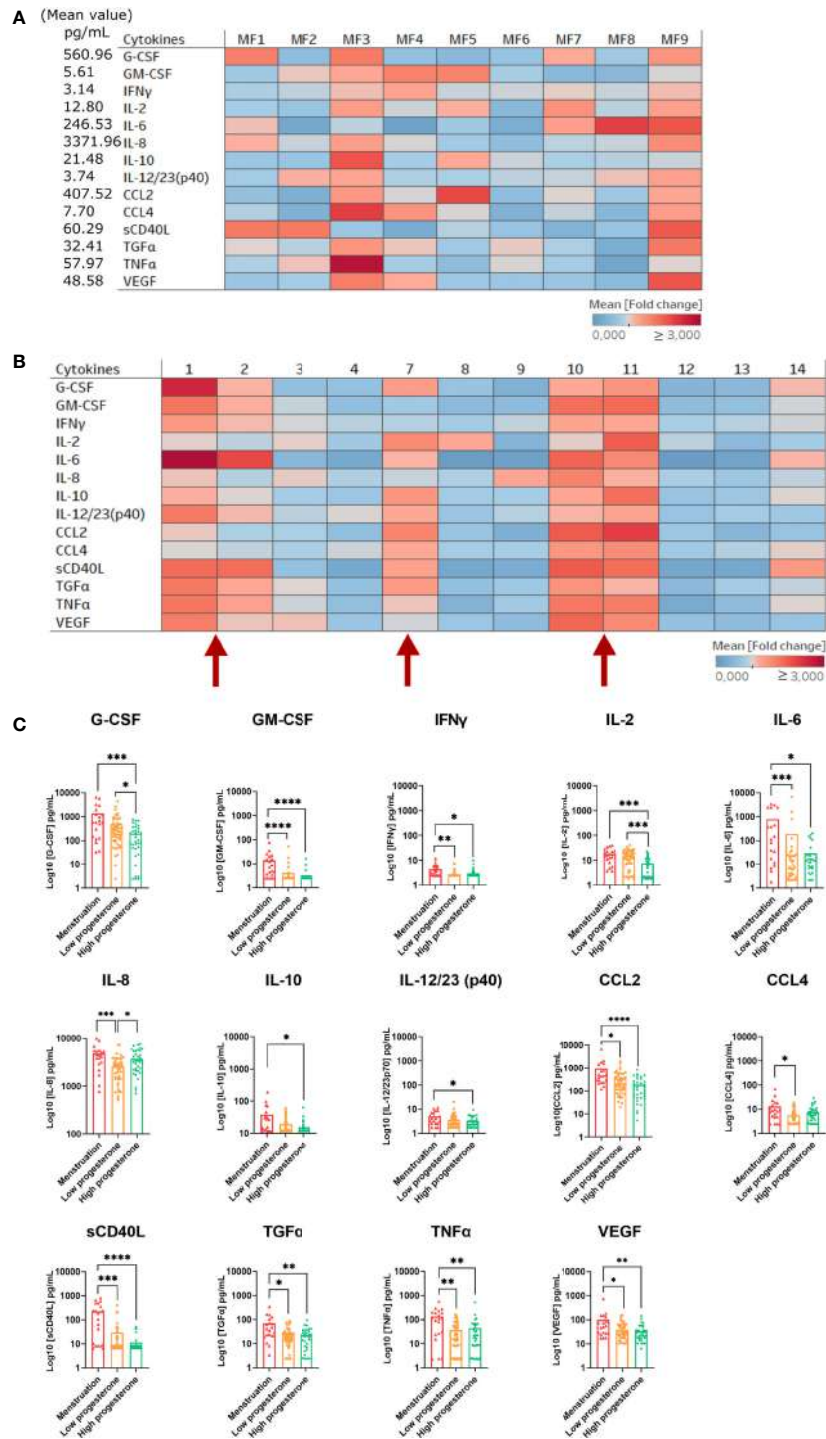


FIGURE 3 | Cytokine and chemokine expression in cervicovaginal fluids of female cynomolgus macaques (n = 9). **(A)** Heatmap representing the mean fold change in the expression of cytokines and chemokines in the cervicovaginal fluids of each animal (n = 9). The fold change was calculated based on the mean expression of each cytokine/chemokine for all females. One way ANOVA was performed to compare the total fold change value to those of each animal for each cytokine. **(B)** Heat map representing the mean fold change in the expression of cytokines and chemokines in the cervicovaginal fluids of all animals (n = 9). The fold change was calculated based on the mean expression of each cytokine/chemokine for each female. Numbers 1 to 14 refers to weeks. Red arrows represent menstruation. **(C)** Samples clustered into three groups based on the progesterone level or menstruation and each cytokine/chemokine concentration was plotted. A Kruskal-Wallis test with Dunn's test to adjust the p value was performed. Asterisks indicate p values considered to be statistically significant (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

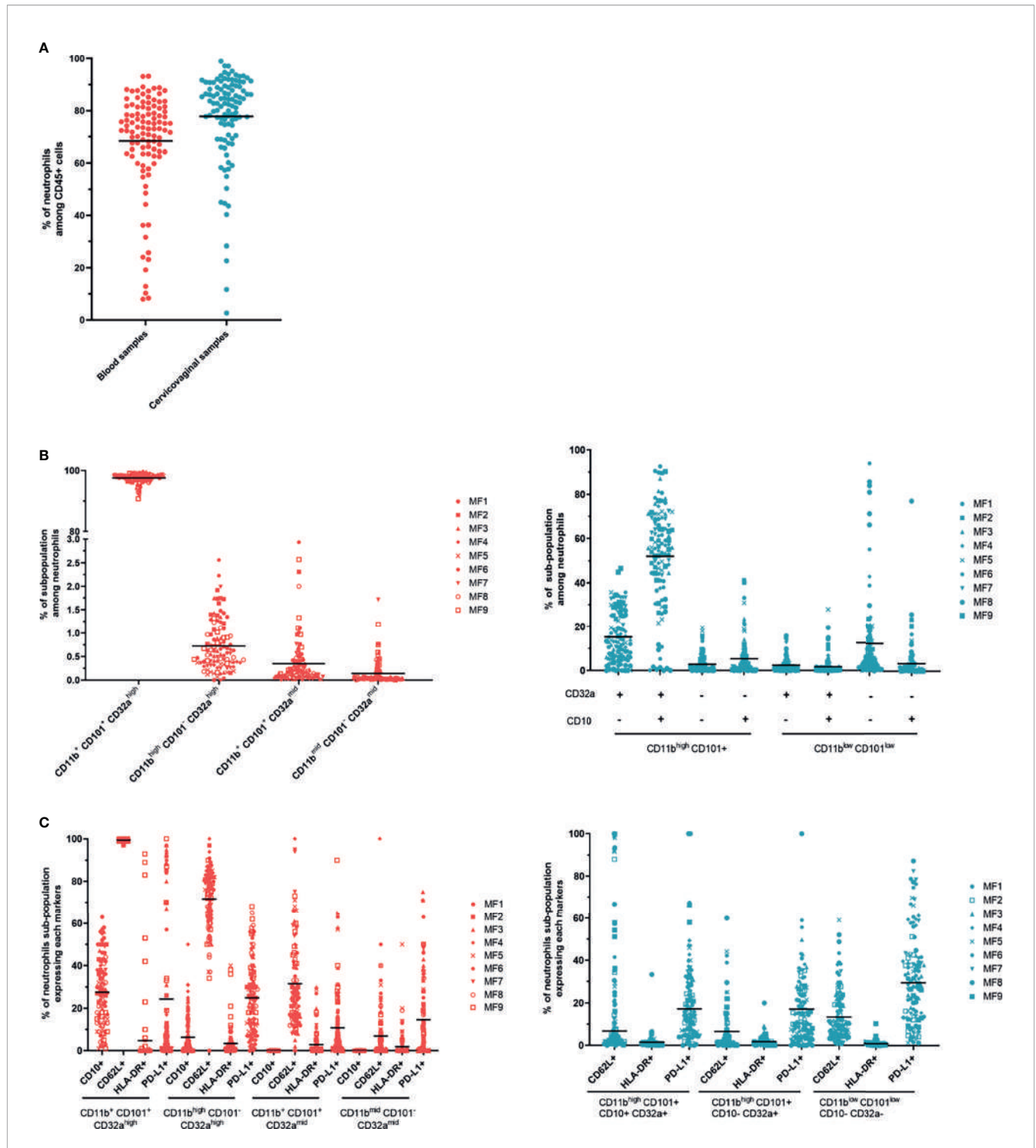


FIGURE 4 | Neutrophil subpopulations in cervicovaginal cytobrushes and blood of female cynomolgus macaques (n = 9). **(A)** Percentage of neutrophils among CD45+ cells in cervicovaginal cytobrushes and blood for all animals. One dot represents one sample of one animal. Blood samples are shown in red and cervicovaginal samples in blue. **(B)** Percentage of neutrophil subpopulations among CD66+ Lin- CD14- CDw125- in blood (left) and cervicovaginal cytobrushes (right) for all females. Each animal is represented by one symbol. **(C)** Percentage of CD62L+, HLA-DR+, and PD-L1+ surface expression for all neutrophil subpopulations in blood (left) and for the main neutrophil subpopulations in cervicovaginal cytobrushes (right).

cervicovaginal cytobrushes were actively involved in phagocytosis, in contrast to whole blood neutrophils (**Supplementary Figures 5A, B**). We observed distinct populations in both compartments. Four populations were observed in the blood (**Table 4**): (A) CD11b⁺ CD101⁺ CD32a^{high}, (B) CD11b^{high} CD101⁻ CD32a^{high}, (C) CD11b⁺ CD101⁺ CD32a^{mid}, and (D) CD11b^{mid} CD101⁻ CD32a^{mid} (**Figure 4B**, left). Population A represented 97.54% ± 0.60 (mean from 96.7% to 98.7%) of the CD45⁺ CD66⁺ LinCD3/CD20/CD8a/CDw125/CD14⁻ cells. The three other populations were only weakly present in the blood, with 0.71% ± 0.34 (mean from 0.2% to 1.3%) for population B, 0.35% ± 0.19 for population C (mean from 0.1% to 0.7%), and 0.14% ± 0.08 for population D (mean from 0.06% to 0.3%). No expression of CD10 was observed in population C or D. By contrast, population A (CD11b⁺ CD101⁺ CD32a^{high}) expressed a low level of CD10 (mean from 12.5% to 50%), suggesting that a portion of this population was mature (**Figure 4C** left).

In the blood (**Figure 4C** left), the percentage of cells expressing CD62L varied among the subsets, with 99.3% ± 0.40 (mean from 98.7% to 99.7%) for population A, 71.4% ± 7.14 (mean from 56.1% to 81.7%) for population B, 31.8% ± 13.08 (mean from 17.4% to 57.6%) for population C, and 6.9% ± 4.51 (mean from 2.2% to 13.4%) for population D. We observed a large variation of PD-L1 expression in each population, indeed 23.8% ± 33.41 (mean from 1.8% to 82.2%) for population A, 25.2% ± 12.25 (mean from 4.5% to 42.9%) for population B, 10.8% ± 9.86 (mean from 2.3% to 26.3%) for population C, and 14.5% ± 13.05 (mean from 2.5% to 42.7%) for population D. Expression of HLA-DR and CD64 was low on neutrophils from both the blood and the cervicovaginal cytobrushes at all timepoints. (**Figure 4C** left, Data not shown for CD64).

In conclusion, there was one major population in the blood, characterized as CD11b⁺ CD101⁺ CD32a^{high}. This population showed variable expression of CD10, suggesting the presence of both mature and immature subsets. In addition, there was high expression of CD62L and variable expression of PD-L1 in this population. Both mature and immature neutrophils expressed the CD62L marker, which decreases upon priming or tissue migration (30–32). Concerning the immunosuppressive marker PD-L1, its increased expression on blood neutrophils has been detected in patients with sepsis and shown to be associated with

reduced phagocytosis and cytokine production (33). We were unable to associate variations in PD-L1 expression with the menstrual cycle or the production of a specific cytokine due to high variability between individuals and timepoints.

Based on the expression of CD11b, CD101, CD10 and CD32, eight populations were determined in cervicovaginal cytobrushes (**Table 5**). However, three main subsets were distinguished: CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁺ CD32a⁺ (mean from 18.3% to 67.1%; population 8), CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁻ CD32a⁺ (mean from 6.5% to 26.4%; population 6) and CD11b^{low} CD101^{low} CD10⁻ CD32⁻ (mean from 4% to 38%; population 7) (**Figure 4B** right). Based on the expression of CD10, CD101, and CD32a, population 8 can be assigned as a mature/activated subset of neutrophils. The mean CD62L expression in these populations was low in cervicovaginal cytobrushes, with only 17% ± 10.77 (mean from 3.1% to 33.9%) for population 8, 6.48% ± 3.18 (mean from 2.5% to 11.3%) for population 6, and 14.49% ± 4.17 (mean from 7.2% to 19.4%) for population 7. PD-L1 expression was the highest in population 7 (mean from 19.5% to 46.5%), followed by population 8 (mean from 14.2% to 27.1%) and population 6 (mean from 9.6% to 25.6%) (**Figure 4C** right).

We further studied the kinetics of the main neutrophil populations in the blood and cervicovaginal cytobrushes. The main neutrophil subset in the blood remained stable. However, the percentage of cervicovaginal neutrophil subpopulations fluctuated over time (**Figure 5A**).

We then classified the neutrophil subpopulations in the peripheral blood and cervicovaginal cytobrushes into three groups based on progesterone level and menstruation. The total neutrophil count in peripheral blood was lower during menstruation than the high-progesterone phase. Only the CD11b^{mid} CD101⁻ CD32a^{mid} population varied with progesterone level, peaking during menstruation (**Figure 5B**). On the contrary, we observed greater variation for cervicovaginal neutrophils. Populations 3, 4, and 7 were less abundant during menstruation than during the high-progesterone phase, whereas the abundance of population 8 was significantly higher during menstruation. Moreover, the abundance of populations 4, 6, and 7 were lower in the low-progesterone group than the high-progesterone group, whereas that of population 8 was higher in the low-progesterone than high-progesterone group. Thus,

TABLE 4 | Neutrophil subpopulations characterized in peripheral blood.

CD11b ⁺ CD101 ⁺	CD11b ⁺ CD101 ⁺	CD11b ^{high} CD101 ⁻	CD11b ^{mid} CD101 ⁻
CD32a ^{high}	CD32a ^{mid}	CD32a ^{high}	CD32a ^{mid}
Population_A	Population_C	Population_B	Population_D

TABLE 5 | Neutrophil subpopulations characterized in cervicovaginal cytobrushes.

CD11b ^{high} CD101 ⁺				CD11b ^{low} CD101 ^{low}			
CD10 ⁺		CD10 ⁻		CD10 ⁺		CD10 ⁻	
CD32a ⁺	CD32 ⁻	CD32a ⁺	CD32 ⁻	CD32a ⁺	CD32 ⁻	CD32a ⁺	CD32 ⁻
Population_8	Population_5	Population_6	Population_4	Population_2	Population_1	Population_3	Population_7

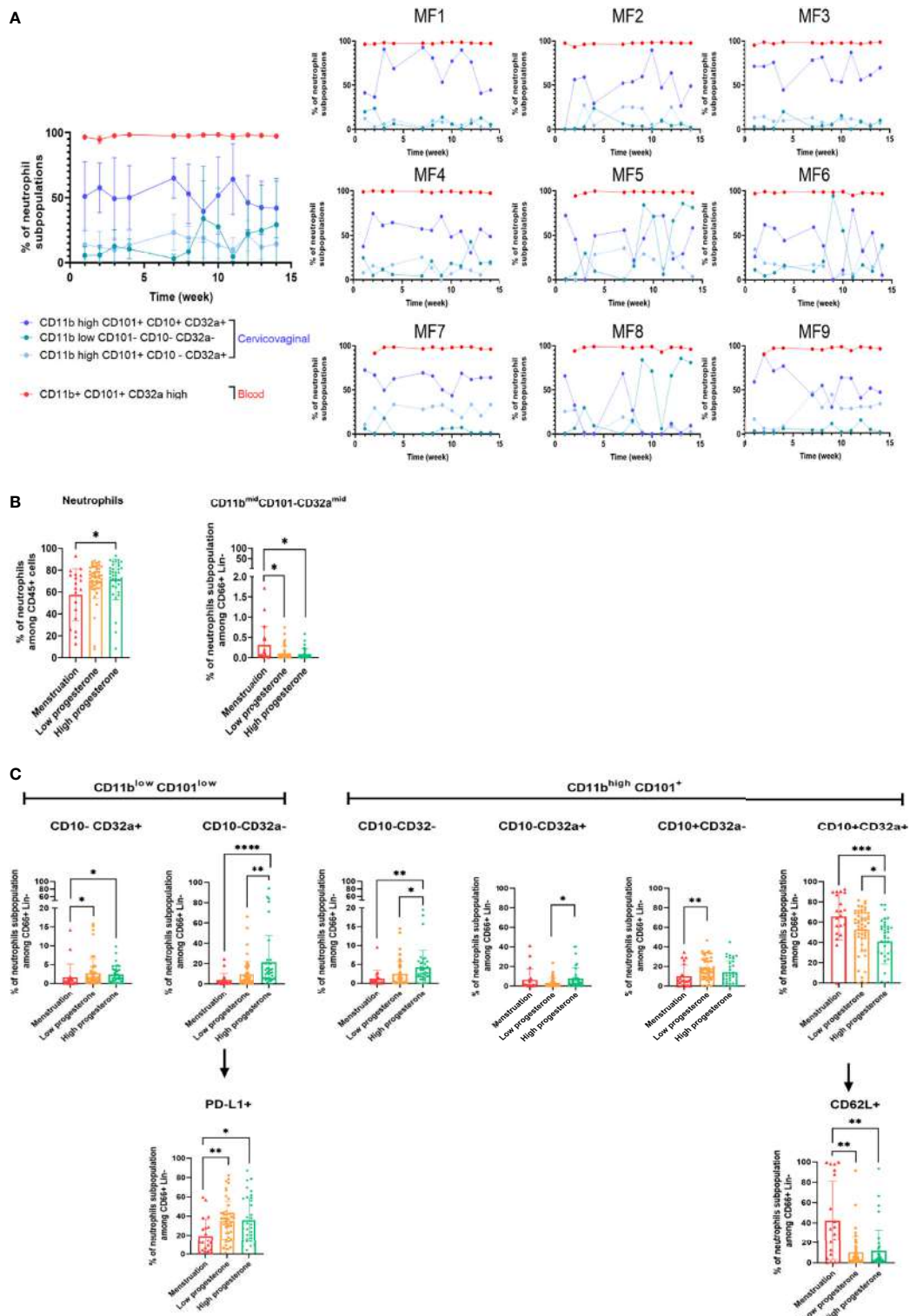


FIGURE 5 | Variation of neutrophil subpopulations in cervicovaginal cytobrushes and blood during the menstrual cycle. **(A)** Main neutrophil subpopulations among CD66+ Lin- cells in both compartments according to the time of collection for all animals (mean of all animals, left) or for each animal (right). Blood **(B)** and cervicovaginal cytobrush **(C)** samples were clustered into three groups based on progesterone levels or menstruation and the percentage of each neutrophil subpopulation was plotted. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test to adjust the p value was performed. Asterisks indicate p values considered to be statistically significant (*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001). Only significant results are presented for **(B)** blood and **(C)** cervicovaginal cytobrushes.

these findings show an increase in neutrophil CD10 expression during menstruation and higher neutrophil CD32a expression during the proliferative than secretory phase. Other markers were also differentially expressed in neutrophils during the menstrual cycle: population 7 expressed lower levels of PD-L1 during menstruation and interestingly, population 8 expressed higher levels of CD62L during menstruation than during the high- and low-progesterone phases (Figure 5C).

Overall, these results highlight the presence of neutrophil subpopulations in the cervicovaginal compartment that are affected by the menstrual cycle in cynomolgus macaques. Menstruation induces the accumulation of mature/activated neutrophils that come from the blood based on their high expression of CD62L, which is usually lower in the tissue (32).

3.3 The Composition of the Vaginal Microbiota Varies by Hormonal Phase

We have shown that inflammation, translated into cervicovaginal cytokine concentrations and neutrophil subpopulations, varies according to the menstrual cycle. As the vaginal microbiota is involved in the regulation of local inflammation, we characterized the composition of the microbiota in parallel to evaluate its variation during the menstrual cycle.

The composition of the microbiota in each animal was studied using two different approaches: Nugent scoring and V3-V4 16S rRNA sequencing. First, the Nugent score was determined for each female at each timepoint to assess whether the female macaques had a diverse or *Lactobacillus* spp dominant vaginal microbiota. There was very little variation in the Nugent score between most of the females. Indeed, seven had a Nugent score of 7 or 8, depending on the timepoint (Supplementary Figure 6). On the contrary, two females (MF6 and MF8) had a variable Nugent score, ranging from 5 to 8. These two females had more Gram-positive bacilli shaped bacteria, which are generally associated with *Lactobacillus* spp. All females showed a diverse vaginal microbiota poor in *Lactobacillus* spp. for most of the timepoints. We then sequenced the V3-V4 region of the 16S rRNA of samples in the study to better characterize the composition of the vaginal microbiota.

We first identified bacteria present in the vaginal microbiota of each animal. Eight phyla were observed. More than 99% of bacteria in the vaginal microbiota came from five phyla (total mean abundance from highest to lowest): *Firmicutes* (29.7% to 64.4%), *Bacteroidota* (14.7% to 34.9%), *Fusobacteriota* (1.1% to 39.6%), *Actinobacteriota* (3.9% to 40.9%), and *Campilobacterota* (0.24% to 7.3%). The other three phyla (*Desulfobacterota*, *Proteobacteria* and *Spirochaetota*) represented less than 1% of the total abundance (Figure 6A and Supplementary Figure 7A). Two females, MF7 and MF8, had a different microbiota composition observed at all taxonomic levels relative to the others (Figure 6). Nine predominant families were observed in all females: *Leptotrichiaceae*, *Prevotellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, a family from the order *Peptostreptococcales-Tissierellales*, *Peptostreptococcaceae*, and *Actinomycetaceae* (Figure 6B). Nine predominant genera were found in all females, showing variable abundance (mean \pm SD) between them: *Sneathia*

(13.6% \pm 0.12), *Prevotella* (12% \pm 0.12), *Porphyromonas* (8.6% \pm 0.07), *Fusobacterium* (7.8% \pm 0.06), *Streptococcus* (7.2% \pm 0.11), *Bifidobacterium* (7% \pm 0.13), *Peptoniphilus* (5.9% \pm 0.05), *Peptostreptococcus* (4.4% \pm 0.04), and *Parvimonas* (4.3% \pm 0.03), whereas the mean abundance of the other genera represented 29% (Figure 6C and Supplementary Figure 7B). *Lactobacillus* spp. were observed in all females but at very low abundance, with MF8 expressing the highest abundance (20.5% \pm 0.15) (Supplementary Figure 7B). MF8 also had more *Actinobacteriota* (40.87% \pm 0.19), related to a higher abundance of *Bifidobacterium* (37.15% \pm 0.18). As for MF7, it had more *Firmicutes* (64.38% \pm 0.044), translating into a high abundance of *Streptococcus* (35.22% \pm 0.12). Moreover, this female also had a very low abundance of *Sneathia* (0.043% \pm 0.00) (Supplementary Figure 7 and Figures 6A, C).

We represented the top nine genera or families for all or each animal according to the hormonal phase to identify changes in bacterial abundance (Figure 7 and Supplementary Figure 8). Bacterial abundance and composition varied according to the hormonal group for all animals. We assessed whether bacterial diversity was affected by the hormonal phase by calculating the Shannon diversity index according to the high- or low-progesterone or menstruation timepoints. We observed higher bacterial diversity (p value: 0.0065) during menstruation than during the high-progesterone phase (Figure 8A). We then performed a statistical analysis of the relative abundance of all families and genera adapted to the high throughput sequencing data for all animals to identify bacterial families and genera that were differentially abundant between progesterone groups (Figures 8B, C). This differential analysis identified 14 families that were differentially abundant according to the hormonal group (Figure 8B). We generated abundance bar plots to identify increases or decreases based on hormonal group (Supplementary Figure 9). The relative abundance of nine families (*Christensellaceae*, *Clostridiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Paludibacteraceae*, *Ruminococcaceae*, and *Streptococcaceae*) was lower and one (*Erysipelotrichaceae*) higher in the high-progesterone than low-progesterone group. Six taxa (*Enterobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Succinivibrionaceae*, *Sutterellaceae*, and *Tannerellaceae*) were less abundant in the high-progesterone than menstruation group. Finally, *Erysipelotrichaceae* was more abundant in the low-progesterone than menstruation group (Figure 8B).

Eight genera (*Arcanobacterium*, *Corynebacterium*, *Finegoldia*, *Howardella*, *Mogibacterium*, *Solobacterium*, *Streptococcus*, and *Sutterella*) were differentially abundant depending on the hormonal phase (Figure 8C and Supplementary Figure 10). Five genera (*Howardella*, *Solobacterium*, *Streptococcus*, *Sutterella*, and *Corynebacterium*) are part of the families *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Streptococcaceae*, *Sutterellaceae*, and *Corynebacteriaceae* were observed to be differentially abundant according to hormonal group.

In conclusion, the results obtained show that the composition of the vaginal microbiota strongly fluctuated according to hormonal phase in all individuals. The main observations include an enrichment of specific bacterial families/genera at

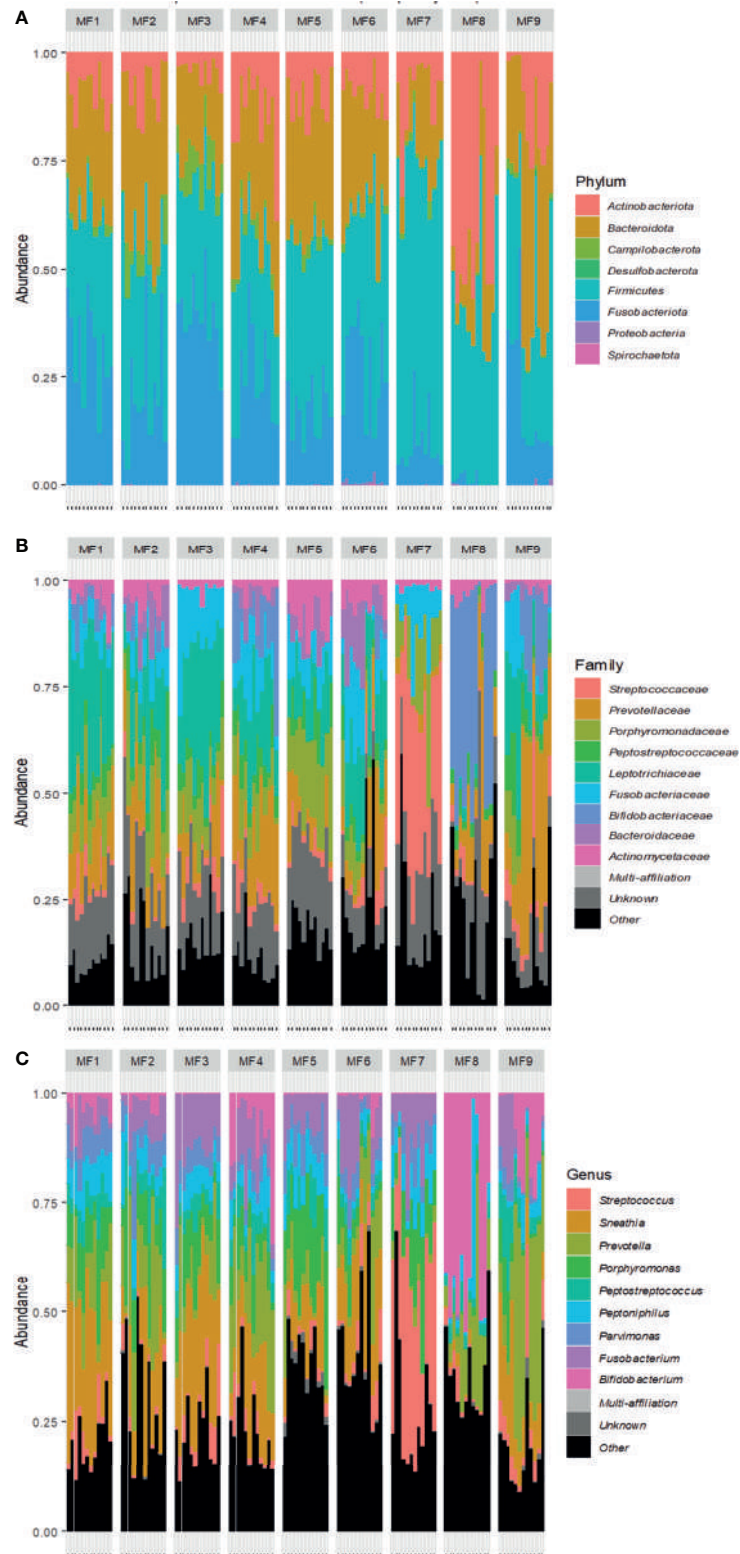


FIGURE 6 | Kinetics of the vaginal microbiota composition of female cynomolgus macaques ($n = 9$). Relative abundance of bacterial taxa at the phylum level **(A)** in each animal according to time. Relative abundance of the nine most represented genera **(B)** or families **(C)** for all females at all time points and each female according to time. The other families and genera are shown in black (other).

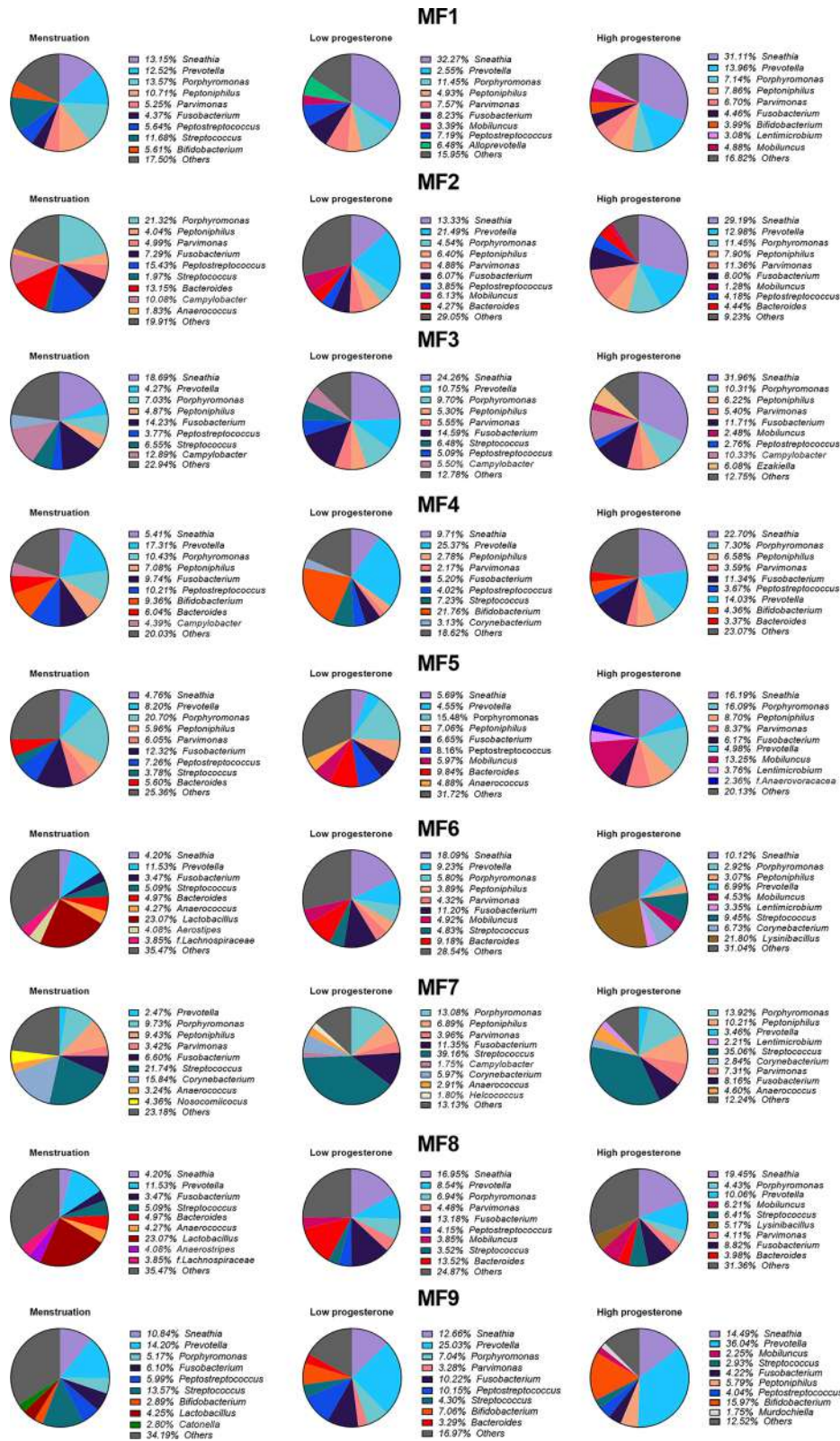


FIGURE 7 | Variation of bacterial taxa during each phase of the menstrual cycle. Percentage of the mean relative abundance of the nine most represented genera in the high-progesterone, low-progesterone, and menstruation groups is represented in a pie chart for each female. Other genera are shown in grey (other).

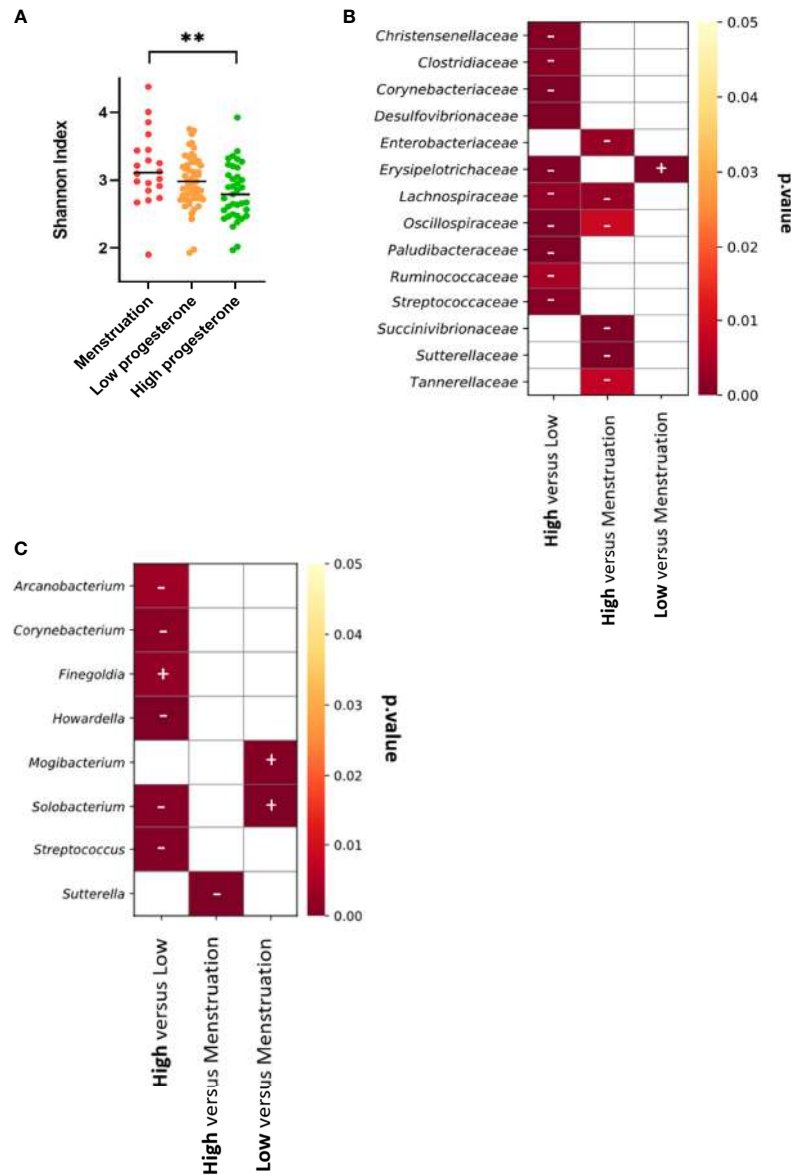


FIGURE 8 | Vaginal microbiota diversity and differentially abundant bacterial taxa in each phase of the menstrual cycle. **(A)** The Shannon index was calculated for each female for the high-progesterone and low-progesterone phases and during menstruation and plotted together. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test to adjust the p value was performed (** $p \leq 0.01$). Analyses were performed using the FitZIG algorithm at the family **(B)** or genus **(C)** level. Heatmaps representing the p values were generated and plus and minus signs were added to visualize increases or decreases in the abundance of each bacterial taxa. The sign is associated with the group in bold text. As an example: the abundance of *Christensenellaceae* was higher during the high-progesterone phase than the low-progesterone phase.

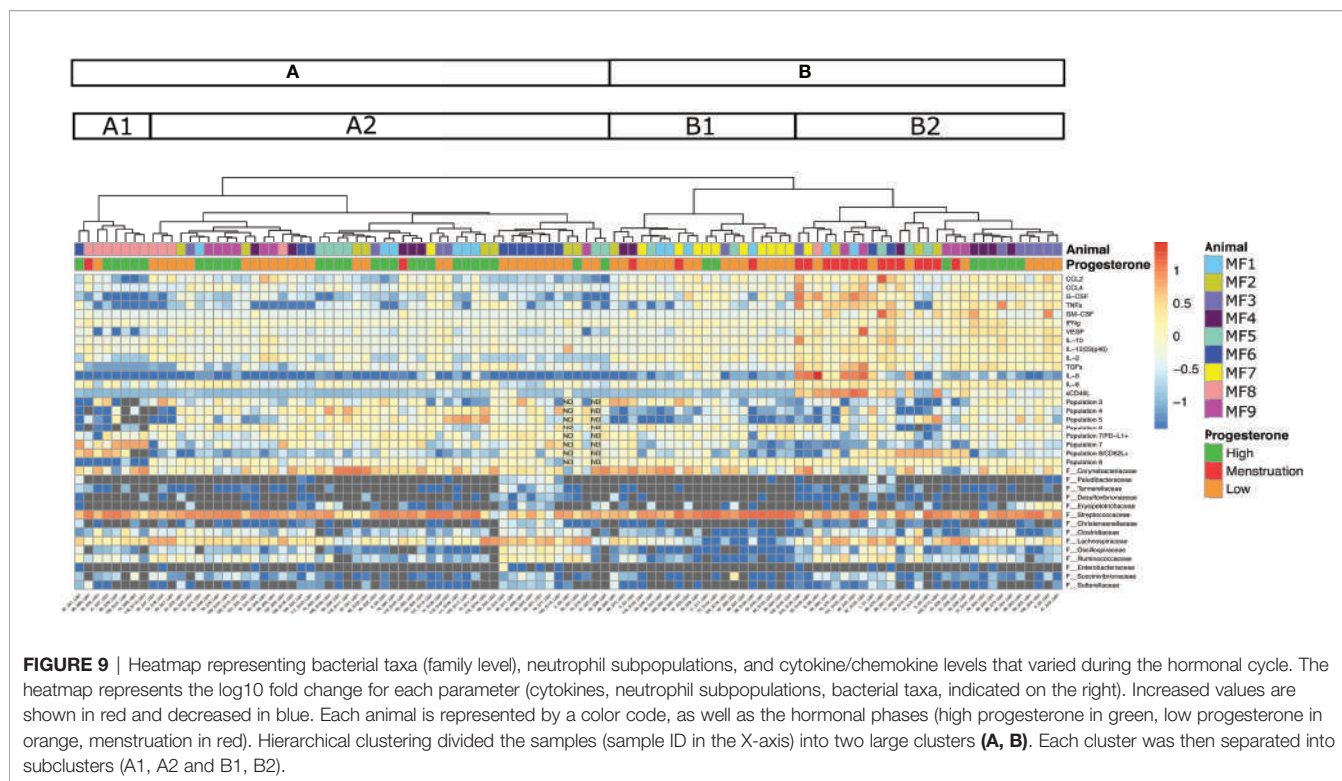
the low-progesterone and menstruation phases relative to the high-progesterone phase.

3.4 Menstruation Induces Higher Local Inflammation

We wished to obtain a global overview of the association between cytokine expression, neutrophil phenotype and activation, and bacterial abundance in the vagina according to the phase of the menstrual cycle. We thus generated a heatmap supplemented by hierarchical clustering that recapitulated all the variables. This

heatmap represents the log₁₀ fold change in cytokine levels, neutrophil populations, and abundance of bacterial taxa at the family level that varied between hormonal phases (**Figure 9**). The hierarchical clustering separated the samples into two large groups (A, B), subdivided into four subgroups (A1, A2, B1, and B2) (**Figure 9**).

The first large group (B) showed low expression of neutrophil subpopulations 3, 4, and 7 and high expression of *Streptococcaceae* in both subgroups. Higher expression of cytokines, such as G-CSF, TNF α , TGF α , IL-6, and sCD40L, as



well as a higher presence of neutrophil subpopulation 8 expressing CD62L and *Lachnospiraceae*, was observed in subgroup B2 than in subgroup B1. A lower abundance of the family *Corynebacteriaceae* was also identified in subgroup B2 than in subgroup B1. Subgroup B2 was mainly composed of samples obtained during menstruation ($\approx 48\%$), followed by low-progesterone ($\approx 27\%$) and then high-progesterone ($\approx 24\%$) samples. By contrast, subgroup B1 was dominated by samples obtained during the low-progesterone phase ($\approx 75\%$), followed by menstruation ($\approx 15\%$) and high-progesterone ($\approx 10\%$) samples. Two animals, MF7 (11/12 samples) and MF3 (8/12 samples), were highly represented in group B. In the second group (A), there was lower expression of cytokines and a higher presence of neutrophils than in group B. Overall, we observed that menstruation is associated with an increase in the concentration of cytokines and the accumulation of a specific neutrophil population, characterized as mature ($CD101^+ CD10^+$) and activated ($CD32a^+$), that may have originated from the blood ($CD62L^+$).

Samples clustered in subgroup A2 showed a small increase in cytokine levels (TGF α and VEGF) and neutrophil subpopulations (3, 4, 5, 6, 7 expressing PD-L1, 7, and 8). However, we observed a decrease in population 8 expressing CD62L relative to subgroup A1, suggesting a lower presence of mature/activated neutrophils originating from the blood. Subgroup A1 showed the low presence of neutrophil subpopulations, such as population 8, and a higher presence of population 7 and higher CD62L expression by population 8, which could be associated with an increased presence of mature neutrophils originating from the blood and weakly activated neutrophils (population 7). Moreover, the abundance of

the family *Streptococcaceae* was lower in subgroup A1 than A2. Subgroup A2 was mainly composed of samples collected at the low-progesterone phase ($\approx 54\%$), followed by high-progesterone ($\approx 44\%$) and menstruation samples ($\approx 0.2\%$). In subgroup A1, 75% of the samples were obtained during the high-progesterone phase, followed by low-progesterone and menstruation samples ($\approx 12.5\%$ each). Subgroup A1 was dominated by the samples of one animal, MF8. Indeed, 10 of the 12 samples of MF8 were observed in group A, in which seven were included in subgroup A1, suggesting a strong similarity among the MF8 samples. Concerning MF6, its samples were mainly affiliated with subgroup A2 (9/12 samples) and 7 of 12 were part of a smaller group.

In conclusion, samples collected during menstruation clustered together and were associated with increased inflammation (high cytokine/chemokine production and the accumulation of mature/activated neutrophils that originated from the blood). Moreover, samples retrieved during the high- or low-progesterone phases were distributed throughout all subgroups. Finally, samples of four animals (MF7, MF3, MF8, and MF6) were observed to be highly consistent among them. Samples from two females (MF7, MF3) expressed more cytokines, whereas the other two showed lower cytokine expression (MF8, MF6) but were different in terms of neutrophil subpopulations.

4 DISCUSSION

Innate and adaptive immune responses have been described to differ between females and males in animal models and humans, suggesting a strong need to study more female cohorts (34). For

example, women infected with HIV-1 exhibit lower plasma viral loads but have a 1.6-fold higher risk for faster progression to the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (35). Furthermore, vaccine responses are different according to sex; women have higher antibody responses and more local and systemic reactions to bacterial and viral vaccines than men (36, 37). The effect of hormones on immune cell recruitment, activation, and soluble factor concentrations in peripheral blood and cervicovaginal lavages of the FRT has been partially studied at each menstrual phase in women. However, there are technical disparities among the studies, such as the absence of hormone measurements and non-longitudinal analysis.

In this study on female cynomolgus macaques, we investigated variations in the vaginal microbiota, cytokine expression, and neutrophil subpopulations in the vagina and blood in a longitudinal study covering three complete menstrual cycles. We show that cervicovaginal environmental factors, such as cytokine and chemokine concentrations, neutrophil populations, and microbiota vary during the menstrual cycle. We highlight that menstruation induces significant alteration of the environment by increasing local inflammation, with an increase of cytokine/chemokine production (GM-CSF, G-CSF, IFN γ , IL-6, CCL2, sCD40L, TGF α , TNF α , VEGF...) and the accumulation of CD11b⁺ CD101⁺ CD32a⁺ CD62L⁺ neutrophils that may originate in the blood. Menstruations lead to an injured endometrium by inducing the shedding of the upper functional layer of the endometrium. The menstruating endometrium triggers an inflammatory response that is necessary for a rapid tissue repair (38). Therefore, the inflammation, associated with an increased production of cytokines such as CCL2, G-CSF, GM-CSF or IL-6, is able to trigger neutrophils recruitment, which might facilitate tissue repair after menstruation.

At steady state, we show that cytokine concentrations are low in the peripheral blood relative to their expression in cervicovaginal fluids. Analysis of culture supernatants of cells isolated from the human FRT and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) show similar differences in terms of cytokine and chemokine expression between the systemic and local compartments (39). Our findings show variability in terms of cytokine production in both compartments according to the animal and the time of the measurement. Nevertheless, only cervicovaginal cytokine production was influenced by the hormonal phase, characterized by a significant increase in cytokine and chemokine concentrations during menstruation. A comparison of cytokine concentrations between menstrual and peripheral blood of women showed differences similar to our results in macaques (40). Several human cohort-based studies have reported variations in cytokine and chemokine levels according to the hormonal cycle in cervicovaginal fluids, but the results were inconsistent and none of the studies collected samples during menstruation (41–43).

Together with the cytokine profiles, we characterized neutrophil subpopulations in the blood and cervicovaginal cytobrushes in female cynomolgus macaques at different time points. The study of Lemaître et al. showed neutrophils in the blood of cynomolgus macaques to be CD45⁺ CD66⁺ Lin(CD3/

CD20/CD8a/CDw125/CD14⁻) and used CD11b/CD32a expression to determine the maturation stage (44). In our study, we added CD10 and CD101 to confirm the maturation status of neutrophils. In female cynomolgus macaques, the percentage of neutrophils among CD45⁺ cells was similar between the peripheral blood and cervicovaginal cytobrushes. Throughout the study, peripheral blood neutrophils had either an immature or mature phenotypes. In contrast, in cervicovaginal cytobrushes, the expression of various markers of neutrophils differed from the one in blood. Indeed, three main populations of cervicovaginal neutrophils were observed, which can be identified, based on the characterization of neutrophils in the blood, as mature/activated (population 8), immature/activated (population 6) and pre-neutrophil like (population 7). Population 7 has a phenotype of pre-neutrophils, a population usually found specifically in the bone marrow (45). May-Grunwald Giemsa staining of neutrophils from the cervicovaginal cytobrushes showed them to be mainly polynuclear and no pre-neutrophils, with a round nucleus, were observed (**Supplementary Figure 3**). The abundance of the main neutrophil populations in cervicovaginal cytobrushes varied according to the hormonal phase. This was not the case for blood neutrophils. More precisely, the abundance of the mature/activated subset expressing CD62L in the cervicovaginal compartment increased during menstruation. This could be due to infiltration of the FRT by mature/activated blood neutrophils because CD62L expression on neutrophils decreases after transmigration into the tissue (31). Moreover, an increase in the concentration of CCL2, G-CSF, GM-CSF, and IL-6 was previously reported to be associated with local neutrophil recruitment upon infection (46–49). Overall, distinct subsets of neutrophils were identified in the blood and in the cervicovaginal compartment. The abundance of the main subset of neutrophils in the cervicovaginal compartment varied according to the hormonal phase in contrast to blood neutrophils.

Neutrophil populations in human blood have been extensively described and characterized as CD15⁺ CD66b⁺ CD49d^{mid} CD101⁺ CD10⁺ CD16⁺ CD62L⁺ (45). Moreover, they increase during the secretory phase (high progesterone concentration), as we observed in cynomolgus macaques (50). Thus far, neutrophils have been studied in the human endometrium and were shown to increase early during the menstrual cycle, leading the authors to hypothesize that such an increase is necessary for tissue repair after menstruation (51). We can assume that the same phenomenon occurs in cynomolgus macaque. Our study is the first to analyze the evolution of innate immune markers, including cervicovaginal neutrophils and cytokine profiles, together with the composition of the vaginal microbiota, according to the phases of the menstrual cycle.

The vaginal microbiota has been described to be closely involved in local immune regulation (13). We thus longitudinally monitored the composition of the vaginal microbiota in parallel with immune marker analysis. We show a predominance of four phyla: *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Fusobacteriota*, and *Actinobacteriota*. The predominant genera were *Sneathia*, *Prevotella*, *Porphyromonas*,

Fusobacterium, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcus*, and *Parvimonas*, in accordance with our previously published study on the characterization of the vaginal and rectal microbiota of female cynomolgus macaques (23). We show that the composition of the vaginal microbiota is subject to hormonal changes. In our previously published study, we did not consider menstruation. Here, we describe that the diversity of the vaginal microbiota increases during menstruation. Increased bacterial diversity during menstruation has also been observed in women, demonstrated by a trend towards the increased abundance of several bacterial taxa, including *Finegoldia*, *Streptococcus*, and *Peptostreptococcus* (2, 52). The abundance of none of these genera significantly increased during menstruation in cynomolgus macaques. These differences could be because most of samples in the study of Song et al. came from women with a *Lactobacillus* spp. dominant microbiota, whereas macaques have a diverse vaginal microbiota similar to dysbiosis in women. During menstruation, six families of bacteria are increased in cynomolgus macaques, including *Lachnospiraceae* and *Succinivibrionaceae*. The modification of the environment associated with the presence of menstrual blood might be responsible for those changes. For instance, iron increase might facilitate the presence of other bacterial families. In fact, in women, iron increase during menstruation is associated with the growth of *G. vaginalis*, a BV associated bacteria (53).

Finally, we analyzed the relationships between immune factors and bacterial taxa that showed differential abundance according to the hormonal phase. The analysis resulted in the clear clustering of samples collected during menstruation. Such clustering suggests increased inflammation (i.e., an increase in cytokine production and mature/activated neutrophils) during menstruation that is not observed during the other hormonal phases. On the contrary, high-progesterone (secretory phase) and low-progesterone (proliferative phase) samples mostly exhibited lower cytokine expression (mainly CCL2, CCL4, IL-6, and sCD40L) and a higher number of less mature and activated neutrophil populations than during menstruation. There were few differences between samples collected during the high- and low-progesterone phases. The analysis also showed animal-specific clusters for four females, whereas the others had a more variable distribution. This observation demonstrates not only strong variability between animals but also within each animal, confirming a specific individual mucosal environment. This is likely why we were unable to associate a group of bacteria or a specific genus to a cytokine profile and/or a neutrophil phenotype. Modification of the vaginal microbiota composition by antibiotic treatment and/or probiotic inoculation could be helpful for this purpose. The determination of such associations would be useful for the development of therapeutic approaches aiming to modify the vaginal microbiota to reduce local inflammation.

In terms of cytokine profiles and neutrophil subpopulations, both the peripheral blood and cervicovaginal compartments were significantly different, highlighting that the blood compartment does not recapitulate what happens in the mucosal compartment. It is thus necessary to investigate the mucosal compartment and not only the systemic one. Our study was performed at steady state, but infection or vaccination could

exacerbate the differences between compartments. Moreover, our results suggest that immune markers and the vaginal microbiota fluctuate within the FRT at the basal state. Such fluctuations are mainly due to the hormonal cycle and must be considered when studying STI infections or mucosal vaccine responses in the mucosa. Indeed, an increase in cytokine expression could be believed to be associated with a vaccine response or immune response against a pathogen, whereas it may, in fact, be due to a physiological change, for example, during menstruation. The impact of hormones has been described in the acquisition of STIs. Indeed, estradiol has been shown to have a positive effect on the mucosal environment by increasing the thickness of the vaginal epithelium and favoring the growth of *Lactobacillus* (2, 7). On the contrary, injectable progestin such as depot medroxyprogesterone acetate (DMPA or MPA) favors an increased bacterial diversity and a decreased of *Lactobacillus* spp likely through a reduction of endogenous estrogen, glycogen and α amylase (8, 10). In addition, progesterone reduces the thickness of the vaginal epithelium in rhesus macaques and increases the incidence of the Simian Immunodeficiency Virus (SIV) (54). These findings highlight the need for extensive characterization of the hormonal impact on the mucosa of the FRT by an appropriate sampling schedule, including several time points. Our data highlight the importance of longitudinal studies for the analysis of immune markers and/or the composition of the vaginal microbiota in humans and animal models. The sampling has to be repeated to account for potential hormonal cycle effects. Otherwise, the results obtained may be biased.

This longitudinal study provides insights into how the phases of the menstrual cycle affect the composition of the vaginal microbiota, as well as that of immune markers, such as cytokine profiles and neutrophil subpopulations. It consequently highlights the difficulties associated with studying the local environment in the FRT and the need for more women-based cohort studies with an appropriate sampling schedule. This complex hormonal regulation needs to be further addressed by including other factors involved in mucosal immunity, such as IgA/IgG quantification and that of immune cells, which have been described to vary in the human endometrium according to the hormonal phase (T and B lymphocytes, Natural Killer and myeloid cells) (55). Further studies should quantify other hormones such as estradiol or FSH in addition to progesterone to better evaluate the hormonal cycle. A better understanding of how hormones regulate the microbiota and immune factors within the FRT is essential to better characterize their impact on the control of acquisition of STIs and mucosal vaccine responses.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Bioproject ID PRJNA768787. Other datasets generated or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Comité d’Ethique en expérimentation animale du commissariat à l’énergie atomique et aux énergies alternatives (CEtEA#44) under statement number (A18-083) and was authorized by the “Research, Innovation and Education Ministry” under registration number APAFIS#20692-2019051709424034v1.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The study was conceived and designed by CA, LR, NN, RM, JL, RLG, M-TN, and EM. The acquisition of the data was performed by CA, LR, CC, and M-TN. Analysis and interpretation of the data was done by CA, LR, NN, Ld’A, EmG, ErG, M-TN, and EM. CA and EM drafted the manuscript. Critical revisions were performed by CA, LR, NN, RM, JL, RLG, M-TN, and EM. The authors declare that they have no competing interests. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The program was funded by the Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT) research infrastructure supported by the “Programme Investissements d’Avenir”, managed by the ANR under reference ANR-11-INBS-0008, as well as Sidaction “financement jeune chercheur” under reference “2019-2-FJC-1234”. The Non-Human Primate study is part of the TracVac project, which received financial support from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 733373.

ACKNOWLEDGMENTS

This work benefited from the facilities and expertise of @BRIDGE (GABI, INRA, AgroParisTech, Paris-Saclay University). The authors would like to thank all members of the ASW (Raphaël Ho Tsong Fang, Nina Dhooge) and L2I (Nathalie Bosquet, Laetitia Bossevoit, Julie Morin) and teams of the IDMIT infrastructure, as well as the members of the Animalliance group (Thierry Prot, Marjorie Benfissa). The authors would also like to thank the bacteriology-virology service of the Lariboisière Hospital (Paris), including Dr Hervé Jacquier, for their help in setting up the Nugent scoring for the vaginal samples from the cynomolgus macaques.

REFERENCES

- Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The Role of Sex Hormones in Immune Protection of the Female Reproductive Tract. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:217–30. doi: 10.1038/nri3819
- Song SD, Acharya KD, Zhu JE, Deveney CM, Walther-Antonio MRS, Tetel MJ, et al. Daily Vaginal Microbiota Fluctuations Associated With Natural Hormonal Cycle, Contraceptives, Diet, and Exercise. *mSphere* (2020) 5(4): e00593-20. doi: 10.1128/mSphere.00593-20
- Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UME, Zhong X, et al. Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. *Sci Transl Med* (2012) 4:132ra52. doi: 10.1126/scitranslmed.3003605
- Boily-Larouche G, Lajoie J, Dufault B, Omollo K, Cheruiyot J, Njoki J, et al. Characterization of the Genital Mucosa Immune Profile to Distinguish Phases of the Menstrual Cycle: Implications for HIV Susceptibility. *J Infect Dis* (2019) 219:856–66. doi: 10.1093/infdis/jiy585
- Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The Normal Menstrual Cycle in Women. *Anim Reprod Sci* (2011) 124:229–36. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.030

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.841723/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | FACS gating strategy for neutrophil phenotyping in blood samples (A) and cervicovaginal cytobrushes (B) of one representative animal.

Supplementary Figure 2 | Cytokine and chemokine expression in the plasma of female cynomolgus macaques according to the phase of the hormonal cycle (n = 9). Samples were clustered into three groups based on progesterone level or menstruation and each cytokine/chemokine concentration (pg/mL) was plotted. A Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s test to adjust the p value was performed.

Supplementary Figure 3 | Cytokine and chemokine expression in the plasma and cervicovaginal fluids (CVF) of female cynomolgus macaques. The mean concentration of each cytokine/chemokine for each animal in the plasma and CVF were plotted and a paired T-test was performed to compare the two compartments. Asterisks indicate p values considered to be statistically significant (*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001).

Supplementary Figure 4 | Localization of neutrophils in the vaginal mucosa. Immunohistochemistry staining of a slide obtained from a vaginal punch (upper vagina near the cervix) of one female cynomolgus macaque. An anti-calprotectin antibody labelled with FITC (green) was used to stain neutrophils and DAPI to stain the nucleus (blue).

Supplementary Figure 5 | Neutrophil morphology in the blood and cervicovaginal cytobrushes. Neutrophil staining by May-Grunwald-Giemsa of (A) cervicovaginal cells obtained from cytobrushes and (B) blood smears of one representative animal (MF7) for all time points. The red star represents menstruation and the black arrow neutrophils.

Supplementary Figure 6 | Nugent scores for each female during the three months follow-up.

Supplementary Figure 7 | Vaginal microbiota composition of the female cynomolgus macaques (n = 9). The percentage of the mean relative abundance of phyla (A) or the top nine most represented genera (B) for all animals (top) or for each female (bottom) are represented in the pie chart.

Supplementary Figure 8 | Variation of the abundance of bacterial taxa in each phase of the menstrual cycle. The mean relative abundance of the nine most represented genera (top) and families (below) in the high-progesterone, low-progesterone, and menstruation groups is represented in the pie chart for all females. Other genera are shown in grey (other).

Supplementary Figure 9 | Graphical representation of the relative abundance of bacterial taxa according to the hormonal phase at the family level. Only bacterial taxa that were differentially expressed according to the hormonal phase are represented.

Supplementary Figure 10 | Graphical representation of the relative abundance of bacterial taxa according to the hormonal phase at the genus level. Only bacterial taxa that were differentially expressed according to the hormonal phase are represented.

6. Dei M, Di Maggio F, Di Paolo G, Bruni V. Vulvovaginitis in Childhood. *Best Pract Res Clin Obstetrics Gynaecol* (2010) 24:129–37. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2009.09.010
7. Mirmonsef P, Hotton AL, Gilbert D, Burgad D, Landay A, Weber KM, et al. Free Glycogen in Vaginal Fluids is Associated With Lactobacillus Colonization and Low Vaginal pH. *PLoS One* (2014) 9:e102467. doi: 10.1371/journal.pone.0102467
8. Jespers V, Kyongo J, Joseph S, Hardy L, Cools P, Crucitti T, et al. A Longitudinal Analysis of the Vaginal Microbiota and Vaginal Immune Mediators in Women From Sub-Saharan Africa. *Sci Rep* (2017) 7:11974. doi: 10.1038/s41598-017-12198-6
9. Brooks JP, Edwards DJ, Blithe DL, Fettweis JM, Serrano MG, Sheth NU, et al. Effects of Combined Oral Contraceptives, Depot Medroxyprogesterone Acetate, and the Levonorgestrel-Releasing Intrauterine System on the Vaginal Microbiome. *Contraception* (2017) 95:405–13. doi: 10.1016/j.contraception.2016.11.006
10. Wessels JM, Lajoie J, Cooper MIJH, Omollo K, Felker AM, Vitali D, et al. Medroxyprogesterone Acetate Alters the Vaginal Microbiota and Microenvironment in a Kenyan Sex Worker Cohort and is Also Associated With Increased Susceptibility to HIV-1 in Humanized Mice. *Dis Models Mech* (2019) 12(10):dmm039669. doi: 10.1242/dmm.039669
11. Gosmann C, Anahtar MN, Handley SA, Farcasanu M, Abu-Ali G, Bowman BA, et al. Lactobacillus-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities are Associated With Increased HIV Acquisition in Young South African Women. *Immunity* (2017) 46:29–37. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.013
12. Tamarelle J, Thiébaud ACM, de Barbeyrac B, Bébear C, Ravel J, Delarocque-Astagneau E. The Vaginal Microbiota and its Association With Human Papillomavirus, Chlamydia Trachomatis, Neisseria Gonorrhoeae and Mycoplasma Genitalium Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Microbiol Infect* (2019) 25:35–47. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.019
13. Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, Bowman BA, Yamamoto HS, Soumillon M, et al. Cervicovaginal Bacteria are a Major Modulator of Host Inflammatory Responses in the Female Genital Tract. *Immunity* (2015) 42:965–76. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.019
14. Stevens JS, Criss AK. Pathogenesis of Neisseria Gonorrhoeae in the Female Reproductive Tract: Neutrophilic Host Response, Sustained Infection, and Clinical Sequelae. *Curr Opin Hematol* (2018) 25:13–21. doi: 10.1097/MOH.0000000000000394
15. Lijek RS, Helble JD, Olive AJ, Seiger KW, Starnbach MN. Pathology After Chlamydia Trachomatis Infection is Driven by Nonprotective Immune Cells That are Distinct From Protective Populations. *Proc Natl Acad Sci USA* (2018) 115:2216–21. doi: 10.1073/pnas.1711356115
16. Deshmukh HS, Liu Y, Menkiti OR, Mei J, Dai N, O'Leary CE, et al. The Microbiota Regulates Neutrophil Homeostasis and Host Resistance to Escherichia Coli K1 Sepsis in Neonatal Mice. *Nat Med* (2014) 20:524–30. doi: 10.1038/nm.3542
17. Zhang D, Frenette PS. Cross Talk Between Neutrophils and the Microbiota. *Blood* (2019) 133:2168–77. doi: 10.1182/blood-2018-11-844555
18. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, et al. Neutrophil Ageing Is Regulated by the Microbiome. *Nature* (2015) 525:528–32. doi: 10.1038/nature15367
19. Hensley-McBain T, Wu MC, Manuzak JA, Cheu RK, Gustin A, Driscoll CB, et al. Increased Mucosal Neutrophil Survival is Associated With Altered Microbiota in HIV Infection. *PLoS Pathog* (2019) 15:e1007672. doi: 10.1371/journal.ppat.1007672
20. Van Esch E, Cline JM, Buse E, Wood CE, de Rijk EPCT, Weinbauer GF. Summary Comparison of Female Reproductive System in Human and the Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*). *Toxicol Pathol* (2008) 36:171S–2S. doi: 10.1177/0192623308327415
21. Weinbauer GF, Niehoff M, Niehaus M, Srivastav S, Fuchs A, Van Esch E, et al. Physiology and Endocrinology of the Ovarian Cycle in Macaques. *Toxicol Pathol* (2008) 36:7S–23S. doi: 10.1177/0192623308327412
22. Shaikh AA, Naqvi RH, Shaikh SA. Concentrations of Oestradiol-17beta and Progesterone in the Peripheral Plasma of the Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*) in Relation to the Length of the Menstrual Cycle and Its Component Phases. *J Endocrinol* (1978) 79:1–7. doi: 10.1677/joe.0.0790001
23. Nugeyre M-T, Tchitchek N, Adapen C, Cannou C, Contreras V, Benjelloun F, et al. Dynamics of Vaginal and Rectal Microbiota Over Several Menstrual Cycles in Female Cynomolgus Macaques. *Front Cell Infect Microbiol* (2019) 9:188. doi: 10.3389/fcimb.2019.00188
24. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, et al. SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python. *Nat Methods* (2020) 17:261–72. doi: 10.1038/s41592-019-0686-2
25. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. *J Clin Microbiol* (1991) 29:297–301. doi: 10.1128/jcm.29.2.297-301.1991
26. Nadkarni MA, Elizabeth M, Jacques NA, Hunter N. Determination of Bacterial Load by Real-Time PCR Using a Broad-Range (Universal) Probe and Primers Set. *Microbiology* (2002) 148:257–66. doi: 10.1099/00221287-148-1-257
27. Escudé F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs With Galaxy Solution. *Bioinformatics* (2018) 34:1287–94. doi: 10.1093/bioinformatics/btx791
28. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics. *PeerJ* (2016) 4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584
29. Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. Differential Abundance Analysis for Microbial Marker-Gene Surveys. *Nat Methods* (2013) 10:1200–2. doi: 10.1038/nmeth.2658
30. Condliffe AM, Chilvers ER, Haslett C, Dransfield I. Priming Differentially Regulates Neutrophil Adhesion Molecule Expression/Function. *Immunology* (1996) 89:105–11. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-711.x
31. Ivetic A. A Head-to-Tail View of L-Selectin and Its Impact on Neutrophil Behaviour. *Cell Tissue Res* (2018) 371:437–53. doi: 10.1007/s00441-017-2774-x
32. Lee D, Schultz JB, Knauf PA, King MR. Mechanical Shedding of L-Selectin From the Neutrophil Surface During Rolling on Sialyl Lewis X Under Flow*. *J Biol Chem* (2007) 282:4812–20. doi: 10.1074/jbc.M609994200
33. Patera AC, Drewry AM, Chang K, Beiter ER, Osborne D, Hotchkiss RS. Frontline Science: Defects in Immune Function in Patients With Sepsis are Associated With PD-1 or PD-L1 Expression and can be Restored by Antibodies Targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol* (2016) 100:1239–54. doi: 10.1189/jlb.4HI0616-255R
34. Klein SL, Flanagan KL. Sex Differences in Immune Responses. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:626–38. doi: 10.1038/nri.2016.90
35. Farzadegan H, Hoover DR, Astemborski J, Lyles CM, Margolick JB, Markham RB, et al. Sex Differences in HIV-1 Viral Load and Progression to AIDS. *Lancet* (1998) 352:1510–4. doi: 10.1016/S0140-6736(98)02372-1
36. Cook IF. Sexual Dimorphism of Humoral Immunity With Human Vaccines. *Vaccine* (2008) 26:3551–5. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.054
37. Engler RJM, Nelson MR, Klote MM, VanRaden MJ, Huang C-Y, Cox NJ, et al. Half- vs Full-Dose Trivalent Inactivated Influenza Vaccine (2004–2005): Age, Dose, and Sex Effects on Immune Responses. *Arch Internal Med* (2008) 168:2405–14. doi: 10.1001/archinternmed.2008.513
38. Critchley HOD, Maybin JA, Armstrong GM, Williams ARW. Physiology of the Endometrium and Regulation of Menstruation. *Physiol Rev* (2020) 100:1149–79. doi: 10.1152/physrev.00031.2019
39. Benjelloun F, Quillay H, Cannou C, Marlin R, Madec Y, Fernandez H, et al. Activation of Toll-Like Receptors Differentially Modulates Inflammation in the Human Reproductive Tract: Preliminary Findings. *Front Immunol* (2020) 11:1655. doi: 10.3389/fimmu.2020.01655
40. Guterstam YC, Strunz B, Ivarsson MA, Zimmer C, Melin A-S, Jonasson AF, et al. The Cytokine Profile of Menstrual Blood. *Acta Obstetrica Gynecol Scandinavica* (2021) 100:339–46. doi: 10.1111/aogs.13990
41. Al-Harathi L, Wright DJ, Anderson D, Cohen M, Matityahu D, Cohn J, et al. The Impact of the Ovulatory Cycle on Cytokine Production: Evaluation of Systemic, Cervicovaginal, and Salivary Compartments. *J Interferon Cytokine Res* (2000) 20:719–24. doi: 10.1089/10799900050116426
42. Kyongo JK, Jespers V, Goovaerts O, Michiels J, Menten J, Fichorova RN, et al. Searching for Lower Female Genital Tract Soluble and Cellular Biomarkers: Defining Levels and Predictors in a Cohort of Healthy Caucasian Women. *PLoS One* (2012) 7:e43951. doi: 10.1371/journal.pone.0043951
43. Francis SC, Hou Y, Baisley K, van de Wijgert J, Watson-Jones D, TT A, et al. Immune Activation in the Female Genital Tract: Expression Profiles of Soluble Proteins in Women at High Risk for HIV Infection. *PLoS One* (2016) 11:e0143109. doi: 10.1371/journal.pone.0143109

44. Lemaitre J, Cosma A, Desjardins D, Lambotte O, Le Grand R. Mass Cytometry Reveals the Immaturity of Circulating Neutrophils During SIV Infection. *J Innate Immun* (2020) 12:170–81. doi: 10.1159/000499841
45. Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, et al. Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity* (2018) 48:364–79.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2018.02.002
46. Symons LK, Miller JE, Tyryshkin K, Monsanto SP, Marks RM, Lingegowda H, et al. Neutrophil Recruitment and Function in Endometriosis Patients and a Syngeneic Murine Model. *FASEB J* (2020) 34:1558–75. doi: 10.1096/fj.201902272R
47. McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, et al. Interplay Between IFN- γ and IL-6 Signaling Governs Neutrophil Trafficking and Apoptosis During Acute Inflammation. *J Clin Invest* (2003) 112:598–607. doi: 10.1172/JCI200317129
48. Balamayooran G, Batra S, Balamayooran T, Cai S, Pacher P, Jeyaseelan S. Intrapulmonary G-CSF Rescues Neutrophil Recruitment to the Lung and Neutrophil Release to Blood in Gram-Negative Bacterial Infection in MCP-1 $^{-/-}$ Mice. *J Immunol* (2012) 189:5849–59. doi: 10.4049/jimmunol.1200585
49. Laan M, Prause O, Miyamoto M, Sjöstrand M, Hytönen AM, Kaneko T, et al. A Role of GM-CSF in the Accumulation of Neutrophils in the Airways Caused by IL-17 and TNF-Alpha. *Eur Respir J* (2003) 21:387–93. doi: 10.1183/09031936.03.00303503
50. Nowak J, Borkowska B, Pawlowski B. Leukocyte Changes Across Menstruation, Ovulation, and Mid-Luteal Phase and Association With Sex Hormone Variation. *Am J Hum Biol* (2016) 28:721–8. doi: 10.1002/ajhb.22856
51. Armstrong GM, Maybin JA, Murray AA, Nicol M, Walker C, Saunders PTK, et al. Endometrial Apoptosis and Neutrophil Infiltration During Menstruation Exhibits Spatial and Temporal Dynamics That Are Recapitulated in a Mouse Model. *Sci Rep* (2017) 7:17416. doi: 10.1038/s41598-017-17565-x
52. Kaur H, Merchant M, Haque MM, Mande SS. Crosstalk Between Female Gonadal Hormones and Vaginal Microbiota Across Various Phases of Women's Gynecological Lifecycle. *Front Microbiol* (2020) 11:551. doi: 10.3389/fmicb.2020.00551
53. Jarosik GP, Land CB, Duhon P, Chandler R, Mercer T. Acquisition of Iron by *Gardnerella Vaginalis*. *Infect Immun* (1998) 66:5041–7. doi: 10.1128/IAI.66.10.5041-5047.1998
54. Marx PA, Spira AI, Gettie A, Dailey PJ, Veazey RS, Lackner AA, et al. Progesterone Implants Enhance SIV Vaginal Transmission and Early Virus Load. *Nat Med* (1996) 2:1084–9. doi: 10.1038/nm1096-1084
55. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and Adaptive Immunity at Mucosal Surfaces of the Female Reproductive Tract: Stratification and Integration of Immune Protection Against the Transmission of Sexually Transmitted Infections. *J Reprod Immunol* (2011) 88:185–94. doi: 10.1016/j.jri.2011.01.005

Conflict of Interest: Authors NN, Ld'A, EmG and ErG were employed by Life&Soft.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Adapen, Réot, Nunez, Cannou, Marlin, Lemaitre, d'Agata, Gilson, Ginoux, Le Grand, Nugeyre and Menu. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3 ETUDE *IN VIVO* DE L'IMPACT DU LS SUR L'INFLAMMATION EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE OU DANS UN CONTEXTE D'INFECTION CT.

3.1 Introduction et Objectifs

Au cours de l'étude précédente, nous avons pu décrire *in vivo* l'évolution de l'environnement local au niveau du TRF au cours du cycle menstruel chez des femelles macaques cynomolgus (Article 2). Nous avons également étudié *in vitro* l'impact du LS sur la réponse de cellules épithéliales de l'endocol à une infection CT en termes de production de cytokines, et l'impact de cette réponse sur le phénotype et la fonction de neutrophiles (Article 1). Dans une autre étude décrite en annexe (Annexe I), nous avons étudié une partie de la réponse immunitaire innée locale et systémique (en termes de production de cytokines et du phénotype des neutrophiles) au cours d'une exposition répétée à de faibles doses de CT *in vivo* chez douze femelles macaques cynomolgus. Dans la continuité de ces études (Article 1, Article 2, Annexe I), l'objectif de ce projet était d'évaluer l'impact du LS, de manière physiologique ou au cours d'une infection CT sur l'environnement local et systémique. Nous avons analysé les populations de neutrophiles, les profils de cytokines/chimiokines au niveau local et systémique chez neuf femelles macaques cynomolgus au cours des expositions successives au LS et/ou à CT. A l'euthanasie, les populations cellulaires ont été étudiées dans le sang, les différents compartiments du TRF, ainsi que dans les ganglions drainants.

3.2 Résultats

Une inoculation de LS n'induit pas le même profil inflammatoire que des inoculations répétées au niveau du TRF. Une seule inoculation induit une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires à H+6 et J+3 post inoculation, alors que des inoculations répétées, n'induisent pas de forte augmentation de la concentration de cytokines dans les fluides cervicovaginaux. A l'inverse, une seule inoculation de PBS induit peu de changements de la concentration de cytokines dans les fluides cervicovaginaux, contrairement à des inoculations répétées, qui sont associées à un profil pro-inflammatoire. Les inoculations de LS induisent également des modifications au niveau des neutrophiles locaux : la détection

de NET est augmentée à H+6 post-inoculation simple ou répétée. Cet effet n'est pas observé pour les inoculations de PBS. Le phénotype des neutrophiles au niveau cervicovaginal ne semble par ailleurs pas affecté par les inoculations de PBS ou de LS. Au niveau sanguin, des modifications de la fréquence des neutrophiles parmi les cellules CD45⁺, ou encore de la fréquence de neutrophiles matures et activés (CD11b⁺ CD101⁺ CD32a⁺ CD10⁺) peuvent être observés suite aux inoculations, mais elles ne sont pas spécifiques du LS ou du PBS.

L'inoculation de CT en présence ou non de LS résulte en l'infection de 3/3 ou 2/3 animaux respectivement. L'inoculation de LS induit une inflammation au niveau vaginal, caractérisée par une production de cytokines pro-inflammatoire à H+6 et J+10 post-inoculation, une augmentation de la détection de NET à H+6 et J+3 post-inoculation. A l'inverse, l'inoculation de CT est associée à une diminution de la concentration de nombreuses cytokines au niveau cervicovaginal, et la quantité de NET varie peu suite à l'inoculation. L'inoculation de CT+LS a un impact sur les niveaux de cytokines et la production de NET dans les fluides cervicovaginaux, qui est intermédiaire par rapport aux deux autres groupes présentés précédemment. Les inoculations n'ont pas d'impact sur le phénotype des neutrophiles au niveau vaginal, et l'impact observé au niveau sanguin n'est pas spécifique d'un groupe. L'inoculation de CT en présence de LS pourrait avoir un impact sur l'abondance de cellules immunitaires au niveau des muqueuses du TRF, et plus particulièrement des lymphocytes T au niveau du vagin et du col de l'utérus. Le recrutement de lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ au niveau vaginal pourrait impacter le risque de co-infection au VIH-1.

Pour conclure, cette étude met en évidence l'impact du LS sur l'inflammation au niveau du TRF. Elle montre pour la première fois l'impact du LS en termes de fonction des neutrophiles au niveau vaginal. L'inoculation de CT en présence de LS a un impact sur la réponse à l'infection et cela souligne l'importance d'études sur les IST en contexte physiologique en présence de LS. Ce facteur est donc à prendre en considération lors du développement de stratégies de prévention ou thérapeutique visant à moduler l'inflammation au niveau local, dans un contexte d'IST ou de forte inflammation locale.

3.3 Article 3

« Seminal plasma impacts the reproductive tract inflammation in female cynomolgus macaque in physiological conditions and during *Chlamydia trachomatis* exposition »

Article en préparation.

Seminal plasma impacts the reproductive tract inflammation in female cynomolgus macaque in physiological conditions and during *Chlamydia trachomatis* exposition

Louis Réot¹, Cindy Adapen², Romain Marlin¹, Claude Cannou^{1,3}, Luc de Chaisemartin⁴, Julien Lemaître¹, Olivier Binois⁵, Nelly Achour Chneiweiss⁵, Sophie Luccantoni¹, Quentin Pascal¹, Anne-Sophie Gallouet¹, Nathalie Bosquet¹, Roger Le Grand¹, Marie-Thérèse Nugeyre^{1,3}, Elisabeth Menu^{1,3}

¹Université Paris-Saclay, Inserm, Commissariat à l'énergie Atomique et aux énergies Alternatives (CEA), Center for Immunology of Viral, Auto-Immune, Hematological and Bacterial Diseases [IMVA-HB/Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT)], Fontenay-aux-Roses, France.

²Micalis Institute, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

³Mucosal Immunity and Sexually Transmitted Infection Control (MISTIC) Group, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France.

⁴INSERM UMR 996 Team 2 "Drug and Chemical Allergy, Immunotoxicology and Immunopathology"

⁵Unité de Biologie de la Reproduction, Préservation de la Fertilité – CECOS, Hôpital Antoine Béclère, France

Abstract

Various factors in the female reproductive tract (FRT), such as seminal plasma (SP), influence the local inflammation and the susceptibility to sexually transmitted infections (STI). Neutrophils are among the first cells recruited to the inflammatory site following a *C. trachomatis* (CT) infection. However, the role of the inflammation at the level of the FRT remains to be clarified, in particular in the context of co-infections. For example, very few is known regarding the role of mucosal neutrophils at the level of the FRT. We developed an *in vivo* female cynomolgus macaque model to study the impact of factors from the environment of the FRT on the female immune response. The objective of this study was to evaluate the impact of SP, in physiological conditions or during a CT infection, on the local and systemic immune responses. We analyzed local cytokine/chemokine profiles and neutrophil markers in nine female cynomolgus macaques during successive exposures to SP and/or CT. At euthanasia, the cell populations were studied in the blood, the different compartments of the FRT and in draining lymph nodes. A single SP inoculation induced a higher inflammatory profile, with an increase production of cytokines and neutrophil extracellular traps (NET) by neutrophils, compared to repeated SP inoculations. The neutrophil phenotype was not specifically affected in the blood or at the cervicovaginal level. Inoculation of CT in the presence or absence of SP resulted in the infection of 3/3 or 2/3 animals, respectively. The inoculation of SP induced an inflammation in the FRT, characterized by an increase of cytokine production, and an increase of NET detection. Conversely, the inoculation of CT was associated with a low genital inflammation. The inoculation of CT+SP had an intermediate impact on cytokine and NET profiles in the cervicovaginal fluids. No specific impact was observed on neutrophil phenotype in the blood or in the vagina. The inoculation of CT in the presence of SP has an impact on the abundance of immune cells at the FRT mucosa, and more particularly of T lymphocytes in the vagina and the cervix. This study highlights the

impact of SP on the genital inflammation at the level of the FRT. It shows for the first time the impact of SP in terms of mucosal neutrophil functions. Thus, it is important to study STI acquisition in heterosexual women in a physiological context in the presence of SP, since the immune response to CT infection varies in presence or not of SP. Our study supports the idea that strategies aiming at modulating the FRT inflammation, and notably neutrophil functions, could be effective to prevent adverse genital health outcomes such as STI acquisition. However, such strategies must remain efficient during semen exposition to have a significant effect on the genital health.

Introduction

The female reproductive tract (FRT) is one of the main gateways for sexually transmitted infection (STI). The FRT is composed of two compartments (the upper and the lower tracts), which structure and immune cell composition differ throughout the vagina to the Fallopian tubes¹. STI can cross the mucosal barrier by several mechanisms, for example thanks to breaches created during intercourse². The transformation zone, located in the cervix at the junction between the upper and the lower tract is a preferential zone for pathogen invasion³. Many factors in the FRT environment determine the susceptibility to STI, either directly or indirectly, for example by modulating the inflammation⁴. For example, STI are mainly carried through semen during transmission from man to woman, and the seminal plasma (SP), the cell-free fraction of the semen, triggers an inflammatory response in the FRT that enhances HIV-1 transmission, by inducing the expression of pro-inflammatory cytokines and the recruitment of neutrophils and then HIV-1 target cells⁵. However, another study shows that repeated exposition to SP lead to a diminution of the risk for SIV acquisition in rhesus macaques⁶. Another factor that can affect STI susceptibility in the FRT environment is STI itself. Indeed, the infection with *Chlamydia trachomatis* (CT), the predominant STI in young women, is responsible for a genital inflammation that leads to an increased susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection^{7,8}.

CT is an obligate intracellular bacterium that preferentially infects endocervical epithelial cells. Most of the time Chlamydiosis is asymptomatic, but a long-term infection (persistence of the bacteria) can cause a chronic inflammation leading to several damages including alterations in the Fallopian tubes, the uterus and the ovaries, responsible for infertility or chronic pain⁹. CT infection leads to a local inflammation⁷, increasing the susceptibility to CT repeated infections or other pathogens such as HIV-1. Indeed, CT infection of the FRT mucosa induces the expression of cytokines that can contribute to HIV-1 replication¹⁰. These cytokines are also responsible for the recruitment of HIV-1 target cells. Moreover, the development of abrasions within the epithelium of the endocervix could facilitate HIV-1 entry throughout the epithelial barrier. Overall, numerous epidemiological studies have shown that CT infection is responsible for an increased susceptibility to HIV-1 infection in the FRT⁸.

The role of the inflammation at the level of FRT remains to be clarified in the context of co-infections¹¹. In particular, the role of innate cellular immunity at the mucosal level has been very little studied, especially during Chlamydia infections and even less during CT/HIV-1 co-infections in a physiological context with seminal fluid. In the FRT, neutrophils represent 10 to 20% of the leucocytes¹. They have a high antimicrobial potential thanks to many functions: reactive oxygen species (ROS) and neutrophil extracellular traps (NET) production, phagocytosis, degranulation of cytokines, antimicrobial peptides or proteases¹²... During STI acquisition, neutrophils are recruited and accumulate in the FRT. For example, during HIV-1 exposition, they are rapidly recruited to the FRT and produce NET that inactivate the virus^{13,14}. However, activation of neutrophils in the FRT could also be detrimental through their secretion of pro-

inflammatory cytokines and induction of lesions in the epithelium that are associated with an increased risk for HIV-1¹⁵. Similarly, during CT infection, GM-CSF production induces a recruitment of neutrophils, enhances their survival and their activation^{16,17}. On the other hand, CT has been shown to paralyze neutrophils through secretion of a *chlamydial protease/proteasome-like activity factor* (CPAF) that inhibit ROS and NET production, allowing the survival and replication of CT¹⁸. Given the implication of neutrophils during SP or STI exposition, the diversity of their functions in health and diseases, it is important to understand their role in a physiological context of CT acquisition.

In this study, we aimed at characterizing the impact of SP and CT on the inflammation at the level of the FRT mucosa, by analyzing the populations of neutrophils, the cytokine profiles and the mucosal immune cell populations. We discussed the consequences of these changes on the susceptibility to HIV-1 co-infection. We postulate that, in a physiological context in presence of SP, CT modify the phenotype and functions of neutrophils as well as the inflammatory state of the cervicovaginal mucosa. Using an *in vivo* female cynomolgus macaque model, we found that a single inoculation of SP induces an inflammatory reaction in the FRT, but repeated inoculations are associated with a low inflammation. SP could have an impact on CT infection *in vivo* and on the host immune response to the infection by modifying the cytokine profile and the recruitment of T lymphocytes in the FRT.

Material and Methods

Ethics statement

Nine sexually mature adult female cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*), aged of 3 to 5 years old and originating from Mauritian AAALAC certified breeding centers were included in this study. All animals were housed in IDMIT facilities (CEA, Fontenay-aux-roses), under BSL-2 containment (Animal facility authorization #D92-032-02, Préfecture des Hauts de Seine, France) and in compliance with European Directive 2010/63/EU, the French regulations and the Standards for Human Care and Use of Laboratory Animals, of the Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, assurance number #A5826-01, US). This study was approved and accredited by the institutional ethical committee “Comité d’Ethique en Expérimentation Animale du Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives” (CEtEA #44) under statement numbers A18-083. The study was authorized by the “Research, Innovation and Education Ministry” under registration number APAFIS#20692-2019051709424034v1. The nine animals were housed in two rooms under controlled conditions of humidity, temperature and light (12h light/dark cycles). The animals were fed once or twice a day with commercial monkey chow and fruits. Water was available ad libitum. They were provided with environmental enrichment including toys and novel food under the supervision of the CEA Animal Welfare Officer.

Constitution of the SP pool

Human seminal plasmas were obtained from the “Centre d’étude et de conservation des œufs et du sperme humains” (CECOS) at Antoine Bécclère Hospital (Clamart, N. Achour-Chneiweiss’s team). Semen was collected from donors that were involved in *in vitro* fertilization protocol. All methods to recruit participants and collect biological samples were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Participants gave their consent for the use for medical research purposes of the samples. They were informed of the study and gave no objection for the use of their samples and data for the study.

The study was defined as a non-interventional study by French Ethical Committee 'Comité de Protection des personnes' (n° 2014/42NICB). The study complies with the methodology reference MR-004 set out by the French data protection authority ('Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés' CNIL) for which Institut Pasteur Paris made a statement compliance with the CNIL (n° 2214728v0). The study was registered on the public directory of the health data hub HDH (N° F20220617111005).

All semens were negatively tested for Hepatitis B and C viruses, HIV, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis* and other bacterial infections by spermaculture. Seminal plasma was obtained after semen centrifugation on gradient density. Seminal plasma from about 100 donors were pooled, aliquoted and characterized for cytokine concentrations.

Experimental design

Nine female cynomolgus macaques (MF1 to MF9) in three experimental groups (SP, CT and CT+SP treated) were studied. Age, weight, haplotype and group distribution are summarized in Supplementary Table 1. The experimental design is represented in the Figure 1. All females were followed-up for 5 weeks to assess their menstrual cycle. Then females from the "SP" and "CT+SP" groups were exposed intravaginally to a single dose then to four repeated doses of SP. Females from the "CT" group were exposed intravaginally to a single dose then to four repeated doses of PBS. In a second phase of the experiment, the animals were exposed intravaginally to a high dose of CT (1.6×10^6 IFU) and/or SP. The animals were followed-up for 10 days and were euthanized with an intracardiac administration of 10 mL of sodium pentobarbital (Dolethal, Vetoquinol, France) under anesthesia. Several clinical parameters including the Nugent score (characterizing the diversity of the vaginal microbiota), the vaginal pH, the rectal temperature and the body weight of the animals were followed up. These parameters did not vary significantly during the study (Supplementary Figure 1).

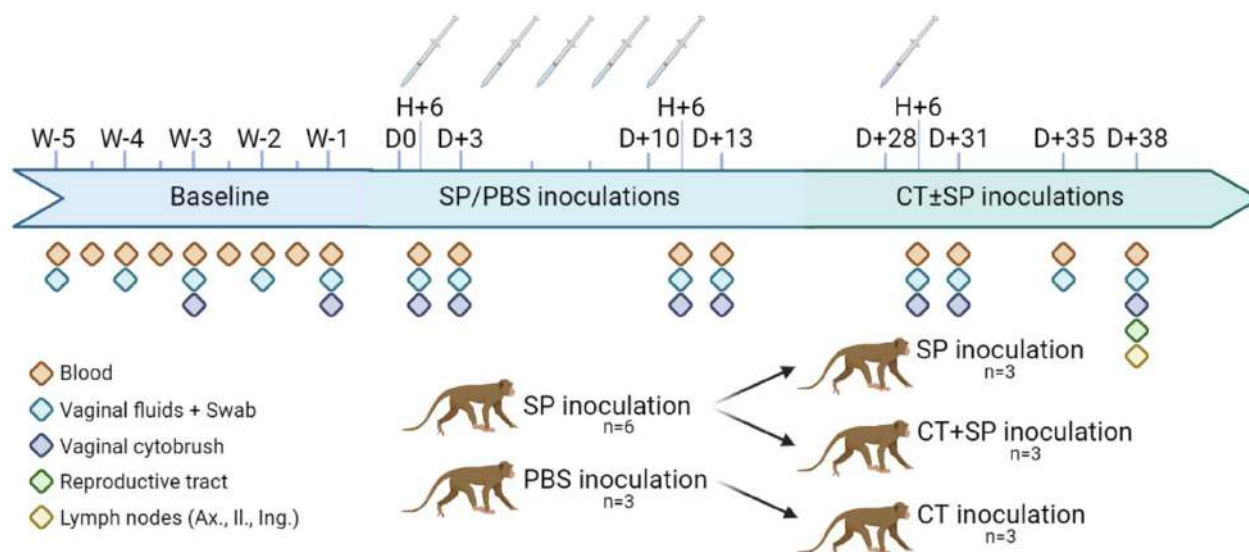


Figure 1: Experimental design. Nine female cynomolgus macaques were included in the study and divided in two groups of three or six animals. After five weeks of baseline, animals received intravaginally (IVAG) a single and then four repeated inoculations of a pool of SP or PBS. Then animals (n=3 per group) were inoculated with a dose of CT (1.6×10^6 IFU) and/or SP. Blood, vaginal fluids, swabs and cytobrushes were collected at H+6 and D+3 post each inoculation. At D+10 post CT and/or SP inoculation, animals were euthanized, lymph nodes and the female reproductive tract were collected. Created with BioRender.com.

Sample collection and cell isolation

Whole blood, vaginal fluid, swab and cytobrush were collected at baseline, before and after each vaginal inoculation and at the time of euthanasia. At euthanasia, the FRT and several lymph nodes (LN) (axillary, iliac, inguinal) were also collected. Sample collection order was as followed: Weck-Cel Spear (Medtronic) during blood withdrawal, vaginal pH measurement, cervicovaginal swab in amies liquid (ELITech Microbio, France) and cytobrushes (VWR; Belgium) in RPMI with 10% Fetal Calf Serum (FCS) 5% Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN). Cervicovaginal fluids were recovered from the spears by adding 600 μ L of elution buffer (PBS, NaCl 0.25M and protease inhibitor mixture; Merck Millipore, Fontenay-sous-Bois, France). Cervicovaginal swabs were used for Nugent score. Cervicovaginal cytobrushes were used to phenotype neutrophil populations by flow cytometry. At necropsy, LN cells were obtained by mechanical dissociation. FRT tissues (vagina, cervix, uterus, and fallopian tubes) were isolated and cut into small pieces. Each tissue was digested for 1 h at 37°C with agitation in digestion buffer, consisting of RPMI 1640 (Fisher Scientific, Illkirch, France), collagenase IV (0.3 mg/ml, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), fetal calf serum (5%, Fisher Scientific), HEPES (0.025 M, Fisher Scientific), DNase (0.1 mg/ml, Roche, Mannheim, Germany), and antibiotics (Fisher Scientific). Undigested pieces were subjected to two more digestion steps. Cell suspensions from LNs and FRT tissues were filtered through 70- μ m sterile nylon cell strainers (BD Biosciences).

C. *trachomatis* infection and quantification

Chlamydia trachomatis serovar D (D/UW3/Cx) were obtained from Dr Frank Follmann laboratory (SSI, Denmark) [25]. Briefly, batches of CT were produced by infecting HeLa cells then 2-3 days after infection, cells were harvested, and CT was purified from the cells. For animal inoculation, CT was diluted in Sucrose Phosphate Glutamate (SPG) buffer to achieve the expected concentration. Each animal received intravaginally 800 μ L of CT inoculum (1.6×10^6 IFU/800 μ L).

Detection of CT in cervicovaginal samples was performed by qPCR. DNA was extracted using the kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen; Germany) according to manufacturer instructions. As for qPCR, the kit Presto combined quantitative real time *Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoea* (Goffin Molecular Technologies; Netherlands) as well as a thermocycler CFX96™ real-time system (Biorad; USA) was used according to manufacturer's instructions.

Progesterone quantification

Progesterone level was determined in peripheral blood plasma samples by ELISA (IBL international; Germany) according to manufacturer's instructions.

Cytokine and chemokine quantification

Pro- and anti-inflammatory cytokines as well as chemokines were quantified in cervicovaginal fluids and plasma by a non-human primate 23-plex assay for the detection of: G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23(p40), IL-13, IL-15, IL-17A, CCL2, CCL3, CCL4, sCD40L, TGF α , TNF α , VEGF, IL-18 (NHP cytokine magnetic bead panel kit; Merck Millipore; Germany), according to manufacturer's instructions.

For the seminal plasma, a human 25-plex assay for the detection of: IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-15, IL-17, TNF α , IFN α , IFN γ , GM-CSF, CCL3, CCL4, CXCL10, CXCL9, CCL11, CCL5 and CCL2 (Human cytokine magnetic 25-plex panel; Life technologies) was used. TGF- β 1, 2 and 3 were detected with another human multiplex assay (MILLIPLEX MAP TGF β Magnetic Bead 3 Plex Kit; Merck Millipore).

NET quantification

NETs were quantified by measuring DNA-MPO complexes in cervicovaginal fluids, using a capture ELISA as previously described¹⁹. Briefly, a 96-well microtiter plate was coated overnight with a rabbit anti-human MPO antibody (5 µg/mL; Millipore). After 2 h of blocking with 2 % BSA, cervicovaginal fluid samples diluted in sample diluent (Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Kit, Roche) were added together with a peroxidase-labeled anti-DNA monoclonal antibody (Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Kit, Roche). After 2h of incubation, the peroxidase substrate was added for 40min at 37°C. Results are expressed as optical absorbance measured at 405 nm with a spectrophotometer, the Spark 10M (TECAN; Switzerland).

Cell phenotyping

Neutrophil populations were analyzed in whole blood and cervicovaginal cells, obtained from cytobrushes. Cervicovaginal cells were filtered with 35µm filter (Corning Falcon; USA). Then, cervicovaginal cells and whole blood were incubated with the antibodies listed in the Supplementary Table 2, washed and fixed with FACS lysing buffer (BD, Biosciences). Neutrophils were identified as CD45⁺, CD66⁺ and Lineage⁻ (CD3, CD8, CD20, CD123, CD14, CDw125). At necropsy, whole blood, LN cells and cells from FRT compartments were analyzed by flow cytometry. The cells were incubated with the antibodies listed in Supplementary Table 3, washed, and then fixed with FACS lysing buffer or BD Cell Fix solution. Cells were filtered with 35µm filter prior acquisition on a ZE5 flux cytometer (Biorad) with Everest (Biorad) and FlowJo (Tristar, USA) software packages for the flow cytometry analysis. A representative image of the gating strategy is illustrated in Supplementary Figure 2.

Statistical analysis

GraphPad prism software version 9 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) was used for graphical representation of the vaginal microbiota, cytokine concentration, and neutrophil subpopulation. Significant differences between groups were confirmed using a two-way ANOVA test and p value adjustment with Turkey test.

Results

A single or repeated SP inoculations induced different inflammatory profiles in the FRT

Two groups of cynomolgus macaques were exposed to PBS (control) or to a SP pool. The seminal plasma pool was characterized in terms of cytokine/chemokine concentration (Figure 2). The pool of seminal plasma had a moderate inflammatory profile, with some pro-inflammatory cytokines expressed (IL-8, CCL2, CXCL9) but also anti-inflammatory cytokines (TGF-β, IL-1RA). As expected²⁰, TGF-β1, -β3 and -β2, respectively, were the most prevalent cytokines in seminal plasma with a combined concentration for TGF-β of 234,4 ng/mL. All animals had their menstrual cycle followed-up before SP/PBS inoculations in order to ensure that none had their menstruation during the inoculations or the sampling. However, two animals (MF1 and MF6, in the SP treated group) had not a regular menstrual cycle and exhibited menstruations during the repeated SP inoculations (Supplementary figure 3).

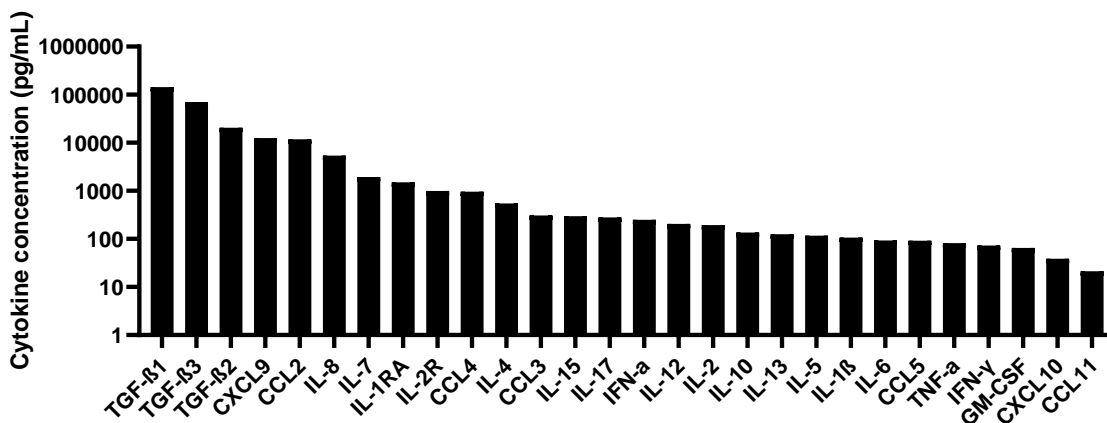


Figure 2: Characterization of the pool of SP. Human semen was collected from donors involved in *in vitro* fertilization protocol. Seminal plasma (SP) was obtained after semen centrifugation on gradient density. SP from about 100 donors were pooled and the cytokine concentration in the pool of SP was characterized by Luminex®.

Impact of PBS or SP inoculation(s) on soluble markers of the local inflammation

After a single SP inoculation, a pro-inflammatory reaction was observed in the FRT at H+6 post-inoculation, characterized by an increase in IL-1 β , G-CSF, IL-6 and IL-10 (Figure 3). These increases were variable between the animals, and some animals exhibited a stronger pro-inflammatory reaction compared to others. The increase in most of those cytokines was persistent at D+3 post inoculation. In contrast, in animals treated with PBS, the cytokine variation is weaker with an increase of VEGF, not sustained at D+3 post-inoculation and a small increase of G-CSF and IL-1 β , which increased further at D+3 post-inoculation. IL-6 concentration was significantly different between the SP group and the PBS group ($p < 0.01$) at D+3 post-inoculation.

After repeated SP inoculations, a low-inflammatory reaction was observed in the FRT at H+6 and D+3 post-inoculation for all the treated animals, compared to a single SP inoculation (Figure 3). For example, the increased in G-CSF was weaker at H+6 compared to a single inoculation, and no increase was observed for IL-6. IL-10 increased at H+6 and furthermore at D+3. The concentration of sCD40L decreased at H+6 and the decrease was confirmed at D+3. In contrast, in animals treated with PBS, the repeated inoculations induce a stronger pro-inflammatory reaction compared to a single PBS inoculation, with the concentration in IL-1 β , G-CSF and TNF α increasing from H+6 to D+3 post-inoculation. IL-1 β concentration was significantly different between the SP and the PBS groups at H+6 and D+3 post-inoculation ($p < 0.01$).

Impact of PBS or SP inoculation(s) on neutrophil phenotype and NETosis

In parallel to the cytokine profiles, neutrophil populations were analyzed in the blood and in the cervicovaginal cytobrushes in the two groups of animals, SP and PBS treated (Figure 4, Supplementary Figure 4). For a single or repeated SP inoculations, an increase in the frequency of blood neutrophils among CD45⁺ cells (Supplementary Figure 4B) was observed at H+6 post-inoculations (single or repeated) in the treated groups (SP or PBS), and this was confirmed by analysis of cell blood count (Supplementary Figure 4A). Moreover, a small but significant increase in the proportion of mature and activated neutrophils (CD101⁺ CD10⁺ CD11b⁺ CD32a⁺) was observed after baseline in both groups, for a single or repeated inoculations (Supplementary Figure 4C). No significant change was observed in the proportion of neutrophils among CD45⁺ cells in cervicovaginal cytobrushes, neither in their phenotype (Figure 4A-B).

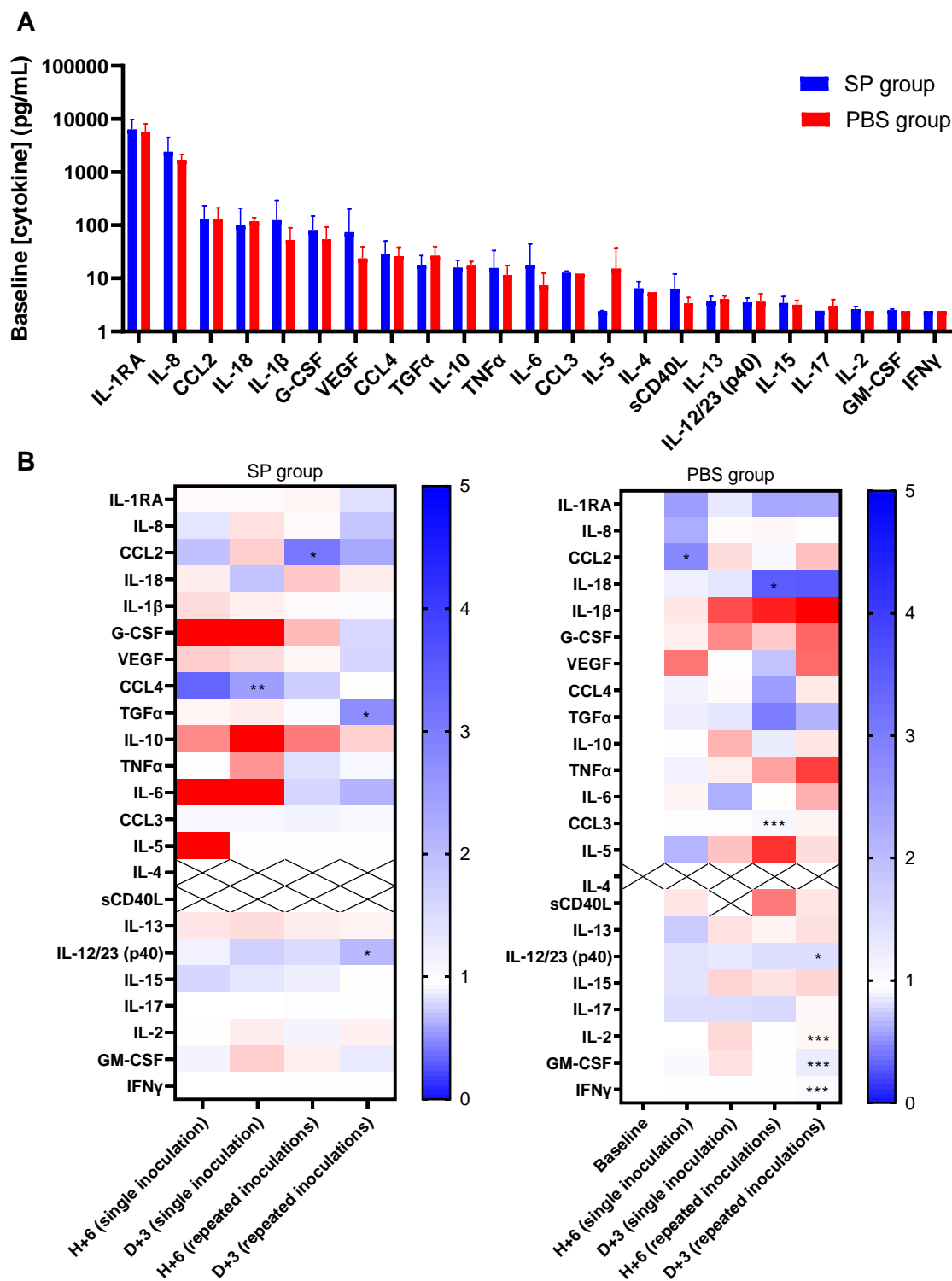


Figure 3: Impact of a single or repeated SP or PBS inoculation(s) on cervicovaginal cytokine production. (A) Basal cytokine concentrations for each group (n=6 for the SP group and n=3 for the PBS group) at baseline. (B) Heatmap representing the mean fold change of cytokine and chemokine concentrations in cervicovaginal fluids in SP and PBS treated animals at H+6 or D+3 post single or repeated inoculation(s). Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test compared to the baseline (*p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001).

Despite a certain variability between the animals, most of the neutrophils in cervicovaginal cytobrushes exhibited a CD101⁺ CD10⁺ CD11b⁺ CD32a⁺ phenotype, with a low frequency of them (10%-20%) expressing PD-L1 (Figure 4B). DNA-MPO complexes, which are released by neutrophils during NETosis, were assessed in cervicovaginal fluids (Figure 4C-D). An increase in DNA-MPO complex concentration was observed at H+6 post-inoculation of SP (single or repeated), but no increase was observed in the PBS treated group (Figure 4C). However, this increase was not statistically significant. At D+3 post-inoculation, the DNA-MPO complex concentration returned to a level close to the baseline.

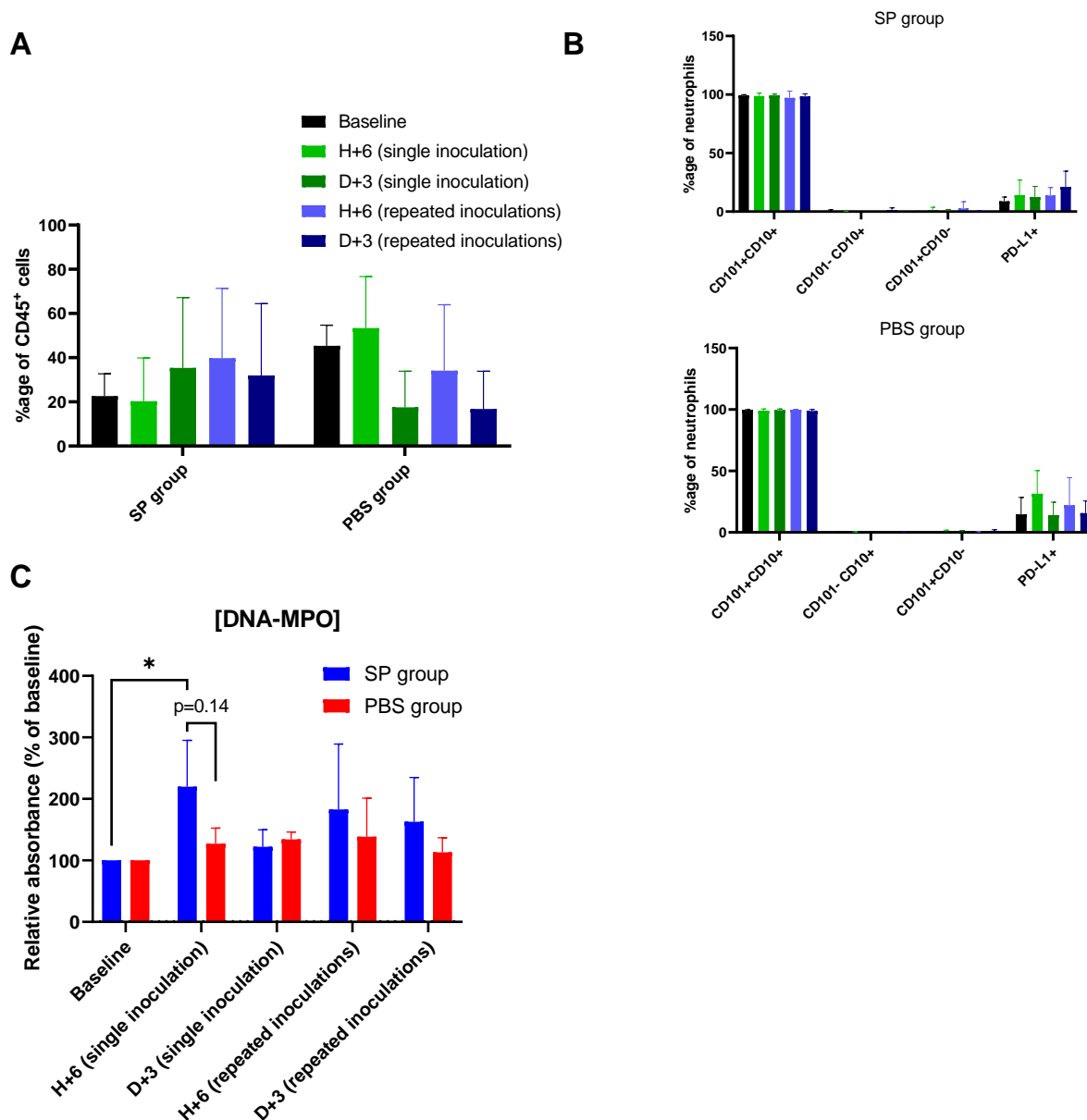


Figure 4: Effect of a single or repeated SP or PBS inoculation(s) on local neutrophil markers. (A) Percentage of cervicovaginal neutrophils (CD66⁺ Lin^(CD3, CD8, CD14, CD20, CD123, CDw125)) among CD45⁺ cells in SP and PBS treated animals at H+6 or D+3 post single or repeated inoculation(s). (B) Percentage of neutrophil subpopulations among total neutrophils in the SP treated group (top) or PBS treated group (bottom). (C) NET quantification by detection of DNA-MPO complexes. Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test (* $p \leq 0.05$).

CT, SP, or CT+SP inoculations induced different inflammatory profiles in the FRT

Three groups of three cynomolgus macaques were then exposed intravaginally to SP and/or CT. Animals that were previously inoculated with PBS (n=3) received a CT inoculation, whereas animals that were previously inoculated with SP (n=6) received either a SP inoculation (n=3) or a CT+SP inoculation (n=3). The menstrual cycle was followed for all the animals before the inoculations to ensure that none had their menstruation during the inoculations or the sampling. However, two animals (MF3 and MF7, in the SP and CT treated groups, respectively) had not a regular menstrual cycle and exhibited menstruations during sampling (Supplementary Figure 3).

CT load in the animals

To quantify CT infection, the bacterial load was determined in cervicovaginal fluids at D+3, D+7 and D+10 post-CT inoculation (Figure 5). The bacterial load at D+3 allowed the quantification of residual bacterial load from the inoculum. An increase in the bacterial load at later time points reveals an active replication of the bacteria and thus an infection. In animals inoculated with SP alone, the signal obtained was below the level of quantification (LOQ = 41 eq IFU/mL), as expected. Animals inoculated with CT in presence of SP presented a bacterial load increasing from D+3 to D+7. In animals inoculated with CT alone, MF7 had a bacterial load equal to the LOQ at D+3, but it decreased at later time points and was below the LOQ. Another animal, MF8, presented a bacterial load below the LOQ at D+3 and D+7 but it increased over the LOQ at D+10. The third animal, MF9, had a high bacterial load at D+3 that slowly decreased at D+7 and D+10. Given previous results obtained in our lab (Martin Siguier et al., unpublished data) regarding the decrease of residual signal from inactivated CT (over one week, the CT load was divided at least by 64 in three animals), we concluded that this animal is infected, because the decrease of CT load in time is too slow to be attributed to the residual of the inoculum (the signal was divided by less than two). In conclusion, all animals were infected in the CT+SP group, whereas for the CT group, two animals were infected.

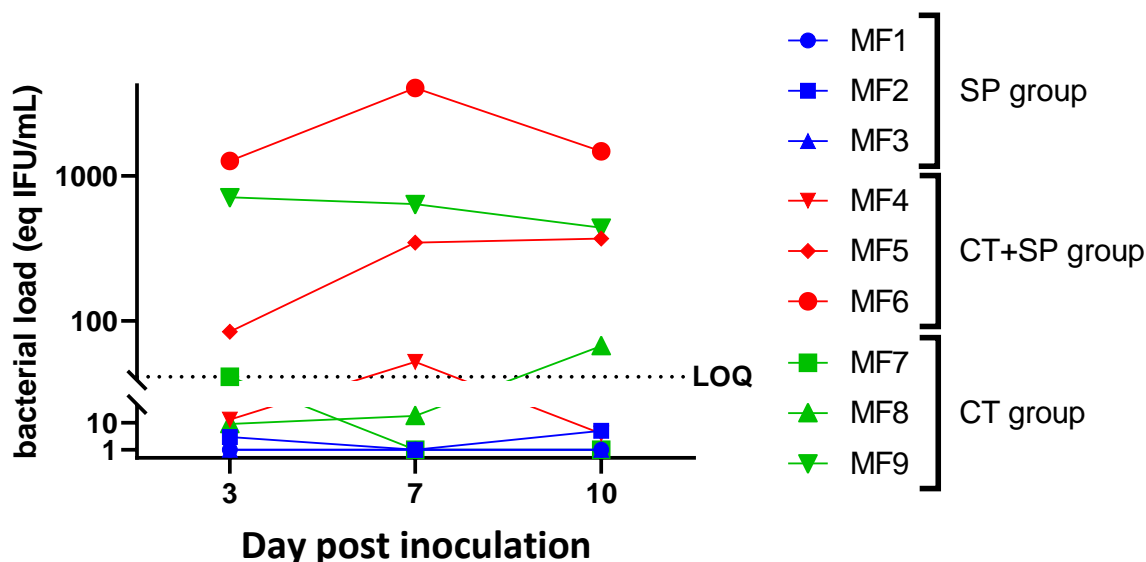


Figure 5: Kinetics of CT load. Graphical representation of log₁₀ transformation of CT load in SP, CT and CT+SP treated animals post intravaginal inoculation. Animals were exposed to a dose of CT of 1.6×10^6 IFU.

Impact of CT and/or SP inoculations on soluble markers of local inflammation

The cytokine response to the intravaginal inoculation was then studied (Figure 6). In the SP group, all animals exhibited a significant decrease in IL-1 β concentration at H+6 and D+3 post-inoculation, but not after, whereas other cytokines such as CCL2, IL-18, G-CSF or VEGF increased following the SP inoculation (Figure 6B, left). At D+3 post-inoculation, the animals exhibited a more pro-inflammatory cytokine profile with for example an increase in IL-6 and G-CSF concentrations. The animals who received a CT inoculation presented a decrease in the concentration of several cytokines (for example: CCL2, CCL4, IL-18, ...), with a strong variability depending on the time point after CT-inoculation (Figure 6B, right). The concentration in IL-10 increased at H+6, D+3 and to a lower extent at D+7 in animals inoculated with CT. Animals that were inoculated with CT in presence of SP exhibited an intermediate profile with an increase of cytokine production at H+6 post-inoculation compared to the baseline, and a more moderate cytokine variation at later timepoints (Figure 6B, center). IL-1 β decreased, CCL2, G-CSF, VEGF and IL-6 increased at H+6 post CT+SP inoculation, as observed for the SP group. At later timepoints, the cytokine profile was different compared to H+6 post CT+SP inoculation: IL-10 increased, TGF α and CCL3 decreased and most of the other cytokines did not vary much. IL-6 concentration at D+3 and GM-CSF at D+7 were significantly different between the CT+SP and the SP group. Overall, animals from the SP group had a high vaginal inflammation, those from the CT group had a low inflammation and animals from the CT+SP group had an intermediate profile.

Impact of CT and/or SP inoculations on neutrophil phenotype and on NETosis

The frequency of blood neutrophils among CD45⁺ cells increased in all groups at H+6 post-inoculation, and this was confirmed by analysis of cell blood count (Supplementary Figure 5A-B). The increase in the proportion of mature and activated neutrophils (CD101⁺ CD10⁺ CD11b⁺ CD32a⁺) in the blood was also observed at H+6 post-inoculation but was only significant for the groups inoculated with CT alone (Supplementary Figure 5C). In cervicovaginal cytobrushes, no significant difference in the frequency of neutrophils among CD45⁺ cells was observed from H+6 to D+10 post-inoculation compared to baseline between the three experimental groups (Figure 7A). However, in the SP group, a small increase in the frequency of neutrophils among CD45⁺ cells was observed at H+6 and later at D+3 post-inoculation. In CT exposed animal, the frequency of neutrophils in cervicovaginal cytobrushes diminished compared to baseline at H+6 post-inoculation. In the animals exposed to CT in presence of SP, the frequency of neutrophils among CD45⁺ cells decreased at D+3 post exposition compared to baseline. Similarly, no significant change was observed in the phenotype of neutrophils in cervicovaginal cytobrushes after CT and/or SP exposition, but some variations could be observed (Figure 7B). Despite a variability between the animals, most neutrophils in vaginal cytobrushes exhibited a CD101⁺ CD10⁺ CD11b⁺ CD32a⁺ phenotype, with a low frequency of them (10%-20%) expressing PD-L1. In the SP group, we noticed a small increase of CD101⁻ CD10⁺ CD11b^{low} CD32a⁻ neutrophils from H+6 to D+7 post-inoculation. In the CT and the CT+SP groups, the frequency of this population was less variable but differed between the groups: it was significantly higher in the CT group compared to the CT+SP group ($p < 0.05$). DNA-MPO complexes were also assessed in cervicovaginal fluids. A significant increase in DNA-MPO complex concentration was observed at H+6 post-inoculation of SP (Figure 7C). This was also observed at D+3 post-inoculation, but the level of DNA-MPO complexes decreased and returned to a level close to the baseline at D+7 and D+10. For the CT+SP and CT groups, the level DNA-MPO complexes was not significantly modified compared to the baseline, at any timepoints. However, in two out of three animals in the CT+SP group, a high level of DNA-MPO complexes was observed at H+6 post-inoculation compared to baseline.

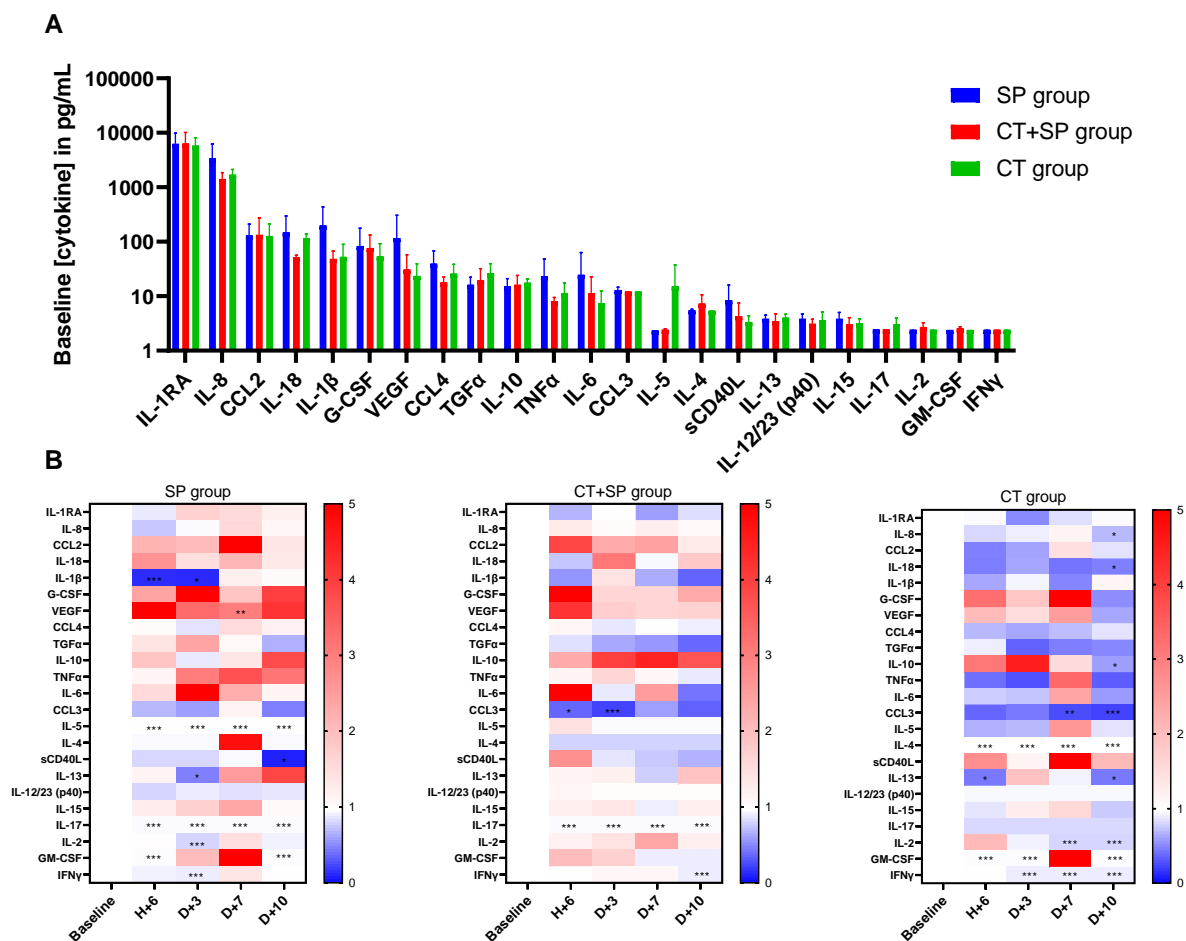


Figure 6: Effect of a SP and/or CT inoculation on cervicovaginal cytokine production. (A) Cytokine concentrations for each group (n=3) at baseline. (B) Heatmap representing the mean fold change of cytokine and chemokine concentrations in cervicovaginal fluids in SP, CT+SP and CT treated animals at H+6, D+3, D+7 and D+10 post-inoculation. Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test compared to the baseline (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Impact of CT and/or SP inoculations on mucosal and systemic immune cell populations

All the animals were euthanized at D+10 post-inoculation and the different compartments of the FRT (vagina, cervix, uterus and Fallopian tubes) were collected as well as lymph nodes (iliac, inguinal and axillary) and blood. Cells were isolated from each tissue and were stained with two flow cytometry panels (Supplementary Table 3). Immune cell populations were compared in the SP and CT+SP groups to assess the effect of CT. Although no significant difference was observed between the SP and CT+SP treated groups for most of the immune population studied, several tendencies can be highlighted in several compartments (Figure 8). The different compartments of the FRT were mainly composed of T lymphocytes, granulocytes and macrophages (Figure 8B, J and K). The proportion of those cells varied in the different compartment of the FRT. T cells exhibited mainly a CXCR3⁺ CD69⁺ phenotype (Figure 8E-F).

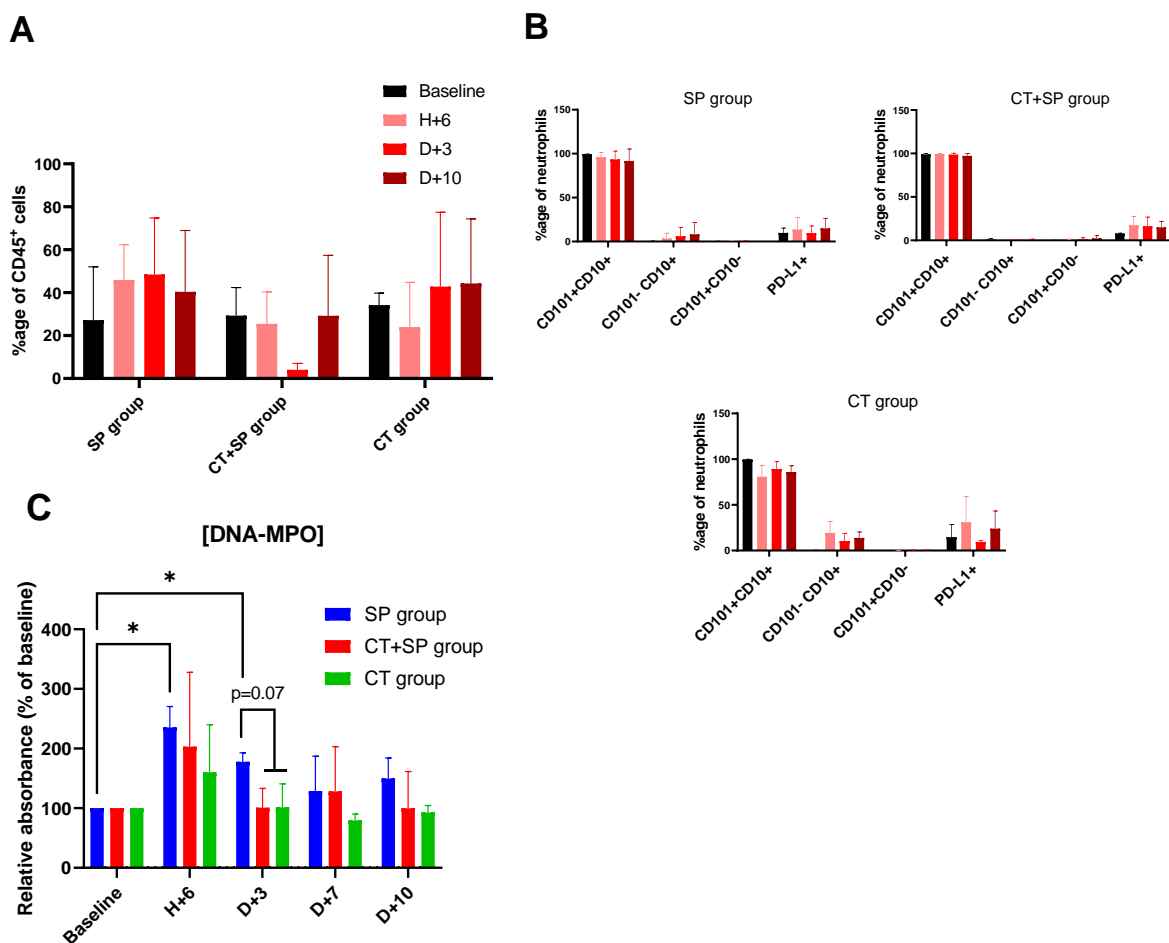


Figure 7: Effect of a SP and/or CT inoculation on cervicovaginal neutrophil markers. (A) Percentage of cervicovaginal neutrophils ($CD66^+ Lin_{(CD3, CD8, CD14, CD20, CD123, CDw125)^-}$) among $CD45^+$ cells in SP, CT+SP and CT treated animals at H+6, D+3, D+7 and D+10 post-inoculation. (B) Percentage of neutrophil subpopulations among total neutrophils in the SP treated group (top left), CT+SP treated group (top right), or CT treated group (bottom). (C) NET quantification by detection of DNA-MPO complexes. Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test (* $p \leq 0.05$).

The CD4/CD8 ratio was superior to 2 in the vagina whereas it was inferior or close to 1 in the other FRT compartments (Figure 8C). In presence of SP, CT inoculation induced an increase of the frequency of T lymphocytes in the vagina and the cervix (Figure 8B). This result has been confirmed by histological scoring of the FRT inflammation on histological sections of the different tissues from the FRT collected at euthanasia. In the vagina, the percentage of $CCR5^+$ cells among $CD4^+$ T lymphocyte is 9% higher in the CT+SP group compared to the SP group (Figure 8D). T_{reg} lymphocytes, defined as $CD25^+ CD127^-$ cells were on the contrary more frequent in the SP treated group in the vagina, the cervix and the uterus (Figure 8G). B cells accounted for 1% of the $CD45^+$ in all the compartments of the FRT, except for the CT+SP treated group in the vagina, where the frequency reached 3.8% (Figure 8H). Others immune cell types including NK cells, granulocytes, macrophages and DC did not vary much between the SP and CT+SP group in the different compartments of the FRT, except for $CD66^+$ cells in the uterus, but this result was not confirmed by the histological scoring of the FRT inflammation on histological sections (Figure 8I-L, Supplementary Figure 6). Immune cells were also isolated from the LN draining the FRT (iliac and inguinal) and compared to a control LN (axillary). For the SP and the CT+SP treated groups, the frequency of the immune cell

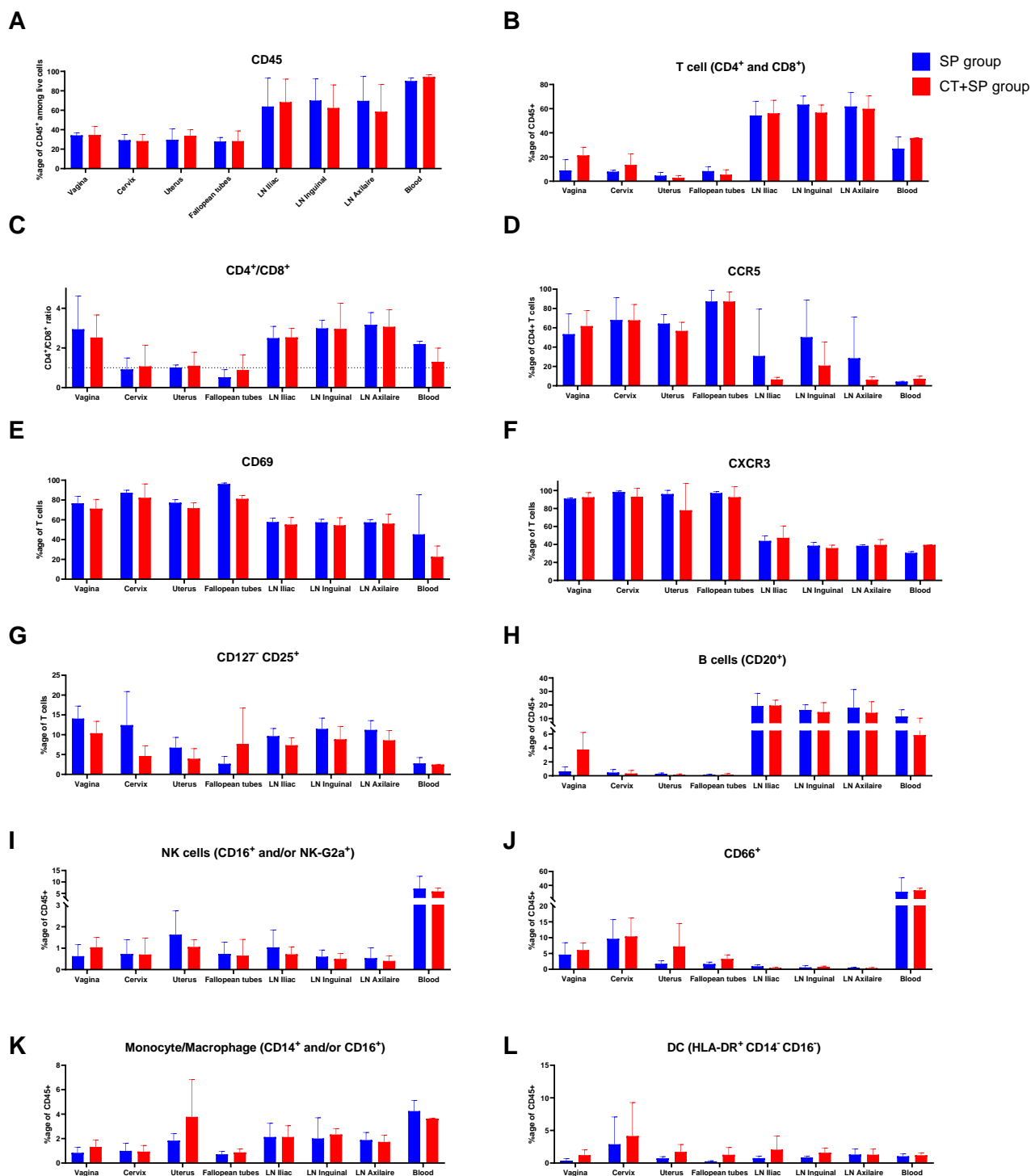


Figure 8: Impact of SP inoculations in the presence or not of CT on immune cell populations. The frequency of various immune cell populations was evaluated by flow cytometry in the compartments of the FRT, LN and blood 10 days post SP or CT+SP inoculation at euthanasia. Frequency of (A) CD45⁺ cells among live cells, (B) T cells among CD45⁺ cells, (C) CD4/CD8 ratio, (D) CCR5⁺ cells among T cells, (E) CD69⁺ cells among T cells, (F) CXCR3⁺ cells among T cells, (G) CD127⁺ CD25⁺ cells among T cells, (H) B cells among CD45⁺ cells, (I) NK cells among CD45⁺ cells, (J) CD66⁺ cells among CD45⁺ cells, (K) Monocytes/macrophages among CD45⁺ cells, (L) DC among CD45⁺ cells.

populations did not differ between the three LN. However, there were some differences between the SP and the CT+SP treated groups for various immune cell populations for all the LN. T cell frequency did not vary between the SP and the CT+SP groups, but more T_{reg} and CCR5⁺ CD4⁺ T cells were detected in the SP treated group (Figure 8D, G). In the blood, not much variation were observed between the groups. In conclusion, in presence of SP, CT induces changes in immune cell frequency at the level of the FRT. Most of these changes occurs in the vagina at the level of T lymphocytes, but some changes were also observed in the LN.

Discussion

SP is a complex fluid that has been shown to have antagonist immune properties depending on the experimental setting^{21,22}. In this study, we enlightened its pro- and anti-inflammatory properties in an *in vivo* experimental model. We showed that a single intravaginal SP inoculation in female macaques was associated with a pro-inflammatory reaction, whether repeated inoculations might have a more tolerogenic effect with a reduced inflammation. The variation in cytokine concentrations detected in cervicovaginal fluids results from a variation in cytokine production by the FRT mucosa because the cytokines involved are different from, or are much more concentrated compared to the one present in the SP. Thus, the detected cytokines do not therefore come mainly from the SP inoculum but are actively produced following SP inoculations. Most increased cytokines found in cervicovaginal fluids after a single SP inoculation, including IL-6 or G-CSF were also found increased in numerous *in vitro* and *in vivo* studies²³⁻²⁵. The short-term response to SP seems mediated by a cytokine regulation but also by changes in local leucocytes^{5,25}. In this study, we found changes in neutrophil function, for example an increase of NETosis after a single SP inoculation. This increase was statistically different from the baseline, but not from the single PBS inoculation group, suggesting a possible nonspecific effect. Differences were also observed in blood neutrophil frequency and phenotype following the inoculations. However, this effect was also observed in the PBS treated (control) group and thus seems to be due to the experimental manipulation of the animal. For example, the increase of blood neutrophil frequency a few hours post manipulation of the female cynomolgus macaques has already been observed in previous studies in our lab²⁶. The stress and/or the anesthesia process might be the cause for those variations. In contrast to the blood neutrophils, SP inoculations does not appear to be accompanied by a change in local neutrophil phenotype. We were not able to quantify the absolute number of local neutrophils in the FRT because vaginal cytobrush sampling cannot be used quantitatively. Nevertheless, we did not see significant changes in the proportion of local neutrophils among CD45⁺ cells, suggesting that SP inoculation is not accompanied by a neutrophil recruitment at H+6 or D+3 post-inoculation. However, many *in vivo* studies have shown that neutrophil recruitment and functions occur during semen exposition and have been shown to be important for sperm cell selection^{25,27-29}. We can hypothesize that the recruitment of neutrophils following semen exposition relies on cells present in the semen, and mediators present in the SP are then able to modulate neutrophils at the level of the FRT, as already shown in horses³⁰. In this animal model, CRISP3 has been identified as a SP protein regulating the interaction between neutrophils and sperm cells³¹. In our study, we showed that SP could modulate local neutrophil functions such as NETosis. Increased NET formation has also been shown following seminal plasma exposition in various animal models including oxen, donkeys and horses³²⁻³⁴. This increase in NETosis at H+6 post SP inoculation could participate to the fertilization process by enabling sperm cell selection or immune regulations at the level of the FRT mucosa. In various animal models, NET have been implicated in infertility, due to the entrapment of sperm cells by NET in the FRT. NET might also be associated with fetal abortion, for example in the context of bacterial infection³⁵.

However up to date, the mechanisms involved in the induction of the NET production are unknown. Understanding the impact of the components of the SP in the regulation of neutrophil function will be critical because those cells have a wide role in genital immune regulations: they are involved in determining reproductive health outcomes including susceptibility to STI.

SP impacts the genital inflammation and could have an impact on STI susceptibility. In a second phase of the experiments, we thus tested the impact of SP on the female response to CT exposition. A control group of three animals were once again inoculated with SP, at least one month after the last repeated SP inoculation. Interestingly, the immune response to this novel inoculation was neither comparable to the one of a single nor of a repeated SP inoculation. On the contrary, we observed a mixed cytokine profile characteristic of an intermediate level of inflammation between those obtained after a single and repeated SP inoculations. This may be a sign of mucosal immune memory.

Six other animals were inoculated with CT, in presence of SP, or not. Up to date, this is the first *in vivo* study evaluating the impact of SP on CT susceptibility. We showed that in presence of SP, CT exposition led to infection of 3/3 animals, whereas only 2/3 were infected in the group exposed without SP. Moreover, for the infected animals, we observed a difference between the bacterial loads within an experimental group. Indeed, the order of magnitude of the bacterial load presented a ten-fold variation within animals of the same group. We also noted that the mean bacterial loads of infected animals were higher in the CT+SP group compared to the CT group. However, this difference was not significant due to the lack of statistical power, thus it is not possible to conclude that SP enhanced CT susceptibility in cynomolgus macaques. Many studies have shown that SP impact STI susceptibility, including HIV-1 acquisition³⁶. Factors in SP have been involved in this modulation: for example, the Semen-derived Enhancer of Virus Infection (SEVI), has been shown to enhance HIV-1 dissemination by promoting viral attachment to its target cells³⁷. However, the role of SP is poorly studied in the context of other STI acquisition, maybe because during heterosexual transmission of STI from male to female, semen is always present. Only a few recent studies investigated the relations between seminal parameters and bacterial STI acquisition³⁸. These studies highlight the importance of measuring seminal biomarkers such as Y-chromosome DNA or prostate specific antigen levels to investigate biological markers in the female genital tract and perform correlation studies between the female and male biological markers^{39,40}. In our study, we were able to dissect the immune response to seminal plasma *in vivo*. The analysis of the cells isolated from the tissues of the FRT and the draining LN at euthanasia revealed that CT exposition induced modifications of immune cell frequency. Given the high inter-individual variability and the low number of animals per group, we did not observe any significant effect, but several tendencies such as a high CD4⁺/CD8⁺ ratio in the vagina compared to the other FRT compartments in the SP and CT+SP treated groups. In female cynomolgus macaques, as in women, this ratio is usually inferior or equal to 1 in all the FRT compartment in physiological conditions⁴¹. In another study from our lab conducted in cynomolgus macaques, SP or PBS were inoculated intravaginally four times over one week. The immune cell populations were analyzed one day after the last intravaginal inoculation. In SP treated animals, the CD4⁺/CD8⁺ ratio was inferior to 1 in the vagina but was greater compared to PBS treated animals⁴². Intravaginal SP inoculations might thus induce a recruitment of CD4⁺ T cells in the vagina. Indeed, an increase in T lymphocyte frequency was observed in the vagina and the cervix. Importantly, in the vagina, some of those cells were CD4⁺ CCR5⁺, which are target cells for HIV-1 infection. *In vivo*, STI acquisition always occurs in presence of SP during heterosexual transmission from male to female. Many epidemiological studies have shown a higher susceptibility to STI when a first STI has been diagnosed⁴³. One of the involved mechanisms could thus be an increased inflammation due to the STI, leading to an

increase susceptibility to other STI⁴⁴. In this *in vivo* study, we propose that the increase in HIV-1 target cells after CT infection might be a mechanism involved in CT/HIV-1 coinfection acquisition. However, other mechanisms might be involved such as the alteration of the epithelial barrier integrity, the modulation of soluble factors in the FRT, the vaginal microbiota perturbation, ... Further investigations are needed to understand the respective roles of the different parameters present locally in the FRT.

Perspectives

-Analysis of the flow cytometry data of the cells isolated from the FRT compartment and draining LN at euthanasia are still ongoing.

-Histological analysis on tissues collected at euthanasia are in progress and could be added to the final manuscript before submission. Several immune markers will be used (CD68, CD163, calprotectin, HLA-DR, CD3 and CD20) to assess the localization of the principal immune cell populations in the FRT compartments. The results will be analyzed in parallel with the flow cytometry data.

-Once all the data are available, a non-supervised analysis will be performed to assess the impact of individual variations or of the different experimental groups on the genital inflammation, CT susceptibility and the immune response to CT infection.

-A more general perspective for this study will be to assess the susceptibility to SP+SIV infection in SP+CT infected animals, compared to the susceptibility of naïve animals to SP+SIV infection. This study will allow to test if the increased frequency in CD4⁺ CCR5⁺ cells observed in SP+CT infected animals lead to a greater susceptibility to SIV infection.

Acknowledgments

The authors would like to thank the members from the IDMIT laboratories: ASW (Francis Relouzat, Victor Magneron), L2I (Laetitia Bossevot, Julie Morin, Loic Pintore and Maxence Galpin-Lebreau), LFC, L3I, LIBI and Admin teams of the IDMIT infrastructure, as well as members of the Animalliance and CRB group for their involvement in the study. The authors would also like to thank Dr Frank Follmann (SSI, Danemark) for kindly providing the CT strain used for the *in vivo* intravaginal exposition in cynomolgus macaques. The authors thank all the donors who provided SP samples, AP-HP (Assistance Publique Hôpitaux de Paris) and clinical personnel for obtaining the samples; the Clinical Core of the CRT (Center of Translational Science) of the Institut Pasteur for their help with biomedical regulatory aspects of the project, in particular Anaïs Perilhou.

Bibliography

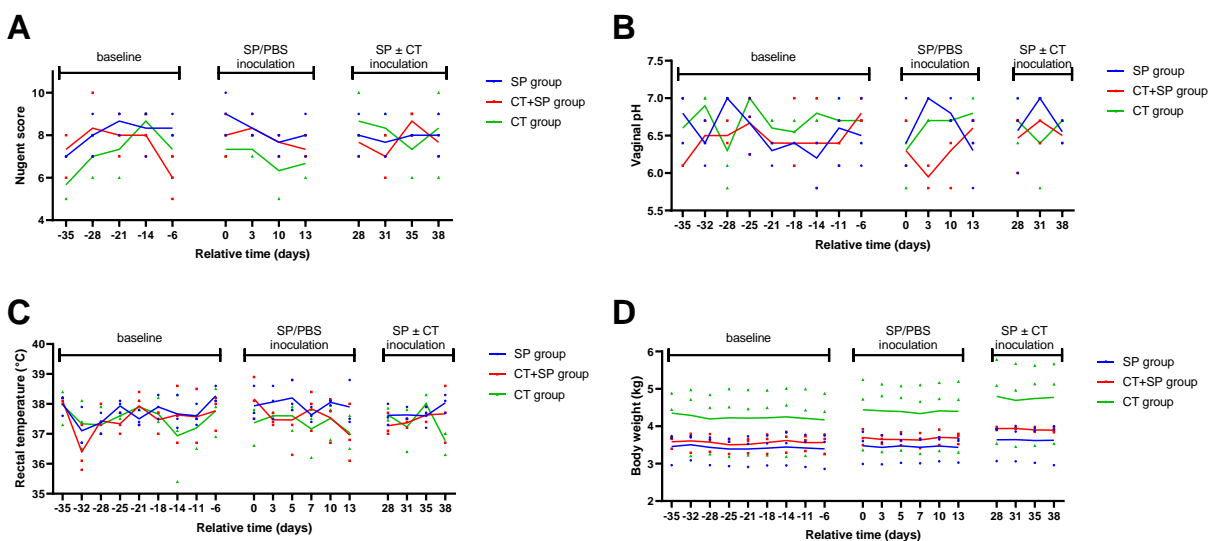
1. Lee, S. K., Kim, C. J., Kim, D.-J. & Kang, J. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw* **15**, 16 (2015).
2. Shen, R., Richter, H. E. & Smith, P. D. Interactions between HIV-1 and Mucosal Cells in the Female Reproductive Tract. *Am J Reprod Immunol* **71**, 608 (2014).
3. Shen, R., Richter, H. E. & Smith, P. D. Early HIV-1 target cells in human vaginal and ectocervical mucosa. *Am J Reprod Immunol* **65**, 261–267 (2011).
4. Ferreira, V. H., Kafka, J. K. & Kaushic, C. Influence of common mucosal co-factors on HIV infection in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* **71**, 543–554 (2014).

5. Schjenken, J. E. & Robertson, S. A. The female response to seminal fluid. *Physiological Reviews* **100**, 1077–1117 (2020).
6. Abdulhaqq, S. A. *et al.* Repeated semen exposure decreases cervicovaginal SIVmac251 infection in rhesus macaques. *Nature Communications* 2019 10:1 **10**, 1–10 (2019).
7. Agrawal, T., Vats, V., Salhan, S. & Mittal, A. The mucosal immune response to Chlamydia trachomatis infection of the reproductive tract in women. *Journal of Reproductive Immunology* **83**, 173–178 (2009).
8. Johnson, L. F. & Lewis, D. A. The effect of genital tract infections on HIV-1 shedding in the genital tract: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Dis* **35**, 946–959 (2008).
9. Campbell, L. A., Marrazzo, J. M., Stamm, W. E. & Kuo, C. C. Chlamydia. *Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections* 795–822 (2022) doi:10.5005/jp/books/12637_40.
10. Freeman, M. L. *et al.* Cytokines and T-Cell Homeostasis in HIV Infection. *J Infect Dis* **214 Suppl 2**, S51–S57 (2016).
11. Adapen, C., Reot, L. & Menu, E. The human vaginal microbiota, its regulation and its role on inflammation and sexually transmitted infection acquisition. Can the Non-Human Primate model contribute to a better understanding of the mechanisms? *Submitted in Frontiers in Reproductive Health* (2022).
12. Liew, P. X. & Kubes, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev* **99**, 1223–1248 (2019).
13. Barr, F. D., Ochsenbauer, C., Wira, C. R. & Rodriguez-Garcia, M. Neutrophil extracellular traps prevent HIV infection in the female genital tract. *Mucosal Immunology* 2018 11:5 **11**, 1420–1428 (2018).
14. Mojoli, A. *et al.* Neutrophil extracellular traps from healthy donors and HIV-1-infected individuals restrict HIV-1 production in macrophages. *Scientific Reports* 2020 10:1 **10**, 1–15 (2020).
15. Connelly, A. N. *et al.* HIV-1 infection is associated with increased prevalence of immature neutrophils and alterations in total neutrophil phenotype and metabolic profile. *The Journal of Immunology* **204**, (2020).
16. Lehr, S., Vier, J., Häcker, G. & Kirschnek, S. Activation of neutrophils by Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is modulated by the chlamydial plasmid. *Microbes Infect* **20**, 284–292 (2018).
17. Lijek, R. S., Helble, J. D., Olive, A. J., Seiger, K. W. & Starnbach, M. N. Pathology after Chlamydia trachomatis infection is driven by nonprotective immune cells that are distinct from protective populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 2216–2221 (2018).
18. Rajeeve, K., Das, S., Prusty, B. K. & Rudel, T. Chlamydia trachomatis paralyzes neutrophils to evade the host innate immune response. *Nat Microbiol* **3**, 824–835 (2018).
19. Jönsson, F. *et al.* An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis. *Sci Transl Med* **11**, (2019).
20. Sharkey, D. J., Tremellen, K. P., Briggs, N. E., Dekker, G. A. & Robertson, S. A. Seminal plasma transforming growth factor- β , activin A and follistatin fluctuate within men over time. *Hum Reprod* **31**, 2183–2191 (2016).
21. Craenmehr, M. H. C. *et al.* Effect of seminal plasma on dendritic cell differentiation in vitro depends on the serum source in the culture medium. *J Reprod Immunol* **137**, (2020).

22. Schjenken, J. E. & Robertson, S. A. Seminal Fluid Signalling in the Female Reproductive Tract: Implications for Reproductive Success and Offspring Health. *Adv Exp Med Biol* **868**, 127–158 (2015).
23. Sharkey, D. J., Macpherson, A. M., Tremellen, K. P. & Robertson, S. A. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod* **13**, 491–501 (2007).
24. Schjenken, J. E., Glynn, D. J., Sharkey, D. J. & Robertson, S. A. TLR4 Signaling Is a Major Mediator of the Female Tract Response to Seminal Fluid in Mice. *Biol Reprod* **93**, (2015).
25. Sharkey, D. J., Tremellen, K. P., Jasper, M. J., Gemzell-Danielsson, K. & Robertson, S. A. Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *J Immunol* **188**, 2445–2454 (2012).
26. Palgen, J. L. *et al.* Prime and Boost Vaccination Elicit a Distinct Innate Myeloid Cell Immune Response. *Scientific Reports* **2018 8:1 8**, 1–18 (2018).
27. Thompson, L. A., Barratt, C. L. R., Bolton, A. E. & Cooke, I. D. The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *Am J Reprod Immunol* **28**, 85–89 (1992).
28. Hong, J. *et al.* Strong inhibition of neutrophil–sperm interaction in cattle by selective phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Biology of Reproduction* **97**, 671–687 (2017).
29. Tomlinson, M. J., White, A., Barratt, C. L. R., Bolton, A. E. & Cooke, I. D. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Human Reproduction* **7**, 517–522 (1992).
30. Alghamdi, A. S., Foster, D. N. & Troedsson, M. H. T. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction* **127**, 593–600 (2004).
31. Doty, A. *et al.* Equine CRISP3 Modulates Interaction Between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils. *Biology of Reproduction* **85**, 157–164 (2011).
32. Alghamdi, A. S. *et al.* Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Anim Reprod Sci* **114**, 331–344 (2009).
33. Alghamdi, A. S. & Foster, D. N. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod* **73**, 1174–1181 (2005).
34. Mateo-Otero, Y. *et al.* Seminal plasma, and not sperm, induces time and concentration-dependent neutrophil extracellular trap release in donkeys. *Equine Vet J* **54**, 415–426 (2022).
35. Hahn, S., Giaglis, S., Hoesli, I. & Hasler, P. Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. *Frontiers in Immunology* **3**, (2012).
36. Introini, A. *et al.* Seminal plasma induces inflammation and enhances HIV-1 replication in human cervical tissue explants. *PLoS Pathog* **13**, (2017).
37. Münch, J. *et al.* Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* **131**, 1059–1071 (2007).
38. Rivera, V. V., Cardona Maya, W. D. & Suárez, J. P. The relationship between sexually transmitted bacteria, microbiota and seminal quality in asymptomatic men. *Asian Journal of Urology* (2021) doi:10.1016/J.AJUR.2021.09.004.
39. Jewanraj, J. *et al.* The Impact of Semen Exposure on the Immune and Microbial Environments of the Female Genital Tract. *Frontiers in Reproductive Health* **0**, 8 (2020).
40. Mngomezulu, K. *et al.* Recent Semen Exposure Impacts the Cytokine Response and Bacterial Vaginosis in Women. *Front Immunol* **12**, 695201 (2021).

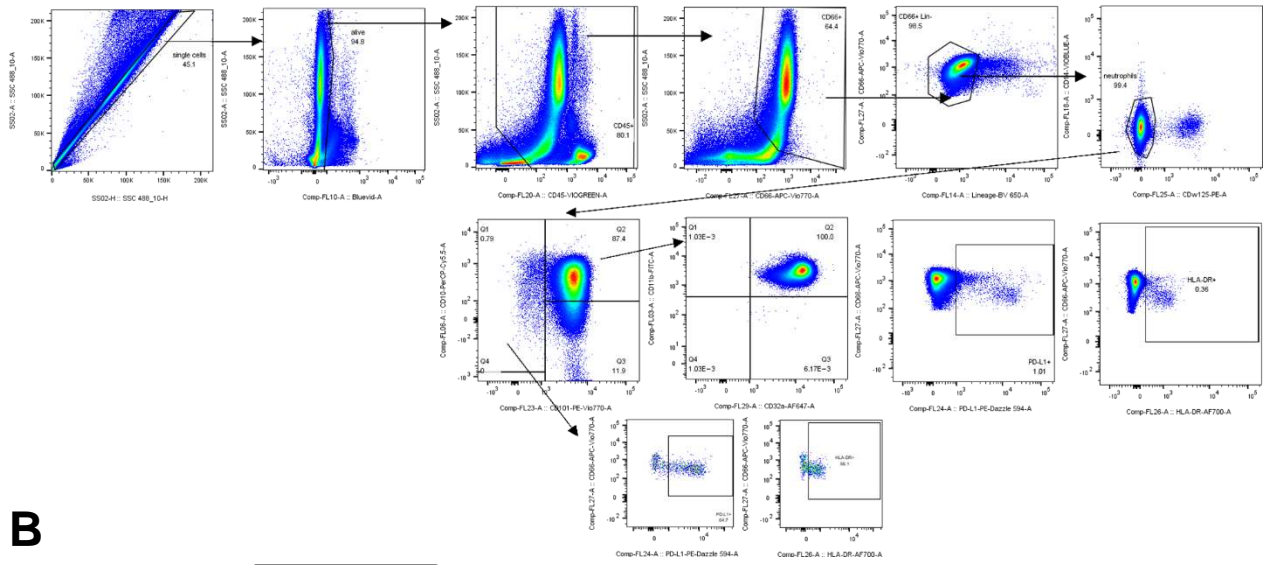
41. Marlin, R. *et al.* Modified Vaccinia Virus Ankara Vector Induces Specific Cellular and Humoral Responses in the Female Reproductive Tract, the Main HIV Portal of Entry. *J Immunol* **199**, 1923–1932 (2017).
42. Marlin, R. *et al.* Seminal plasma exposures strengthen vaccine responses in the female reproductive tract mucosae. *Frontiers in Immunology* **10**, 430 (2019).
43. Freeman, E. E. *et al.* Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS* **20**, 73–83 (2006).
44. Atashili, J., Poole, C., Ndumbe, P. M., Adimora, A. A. & Smith, J. S. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS* **22**, 1493–1501 (2008).

Supplementary Figures

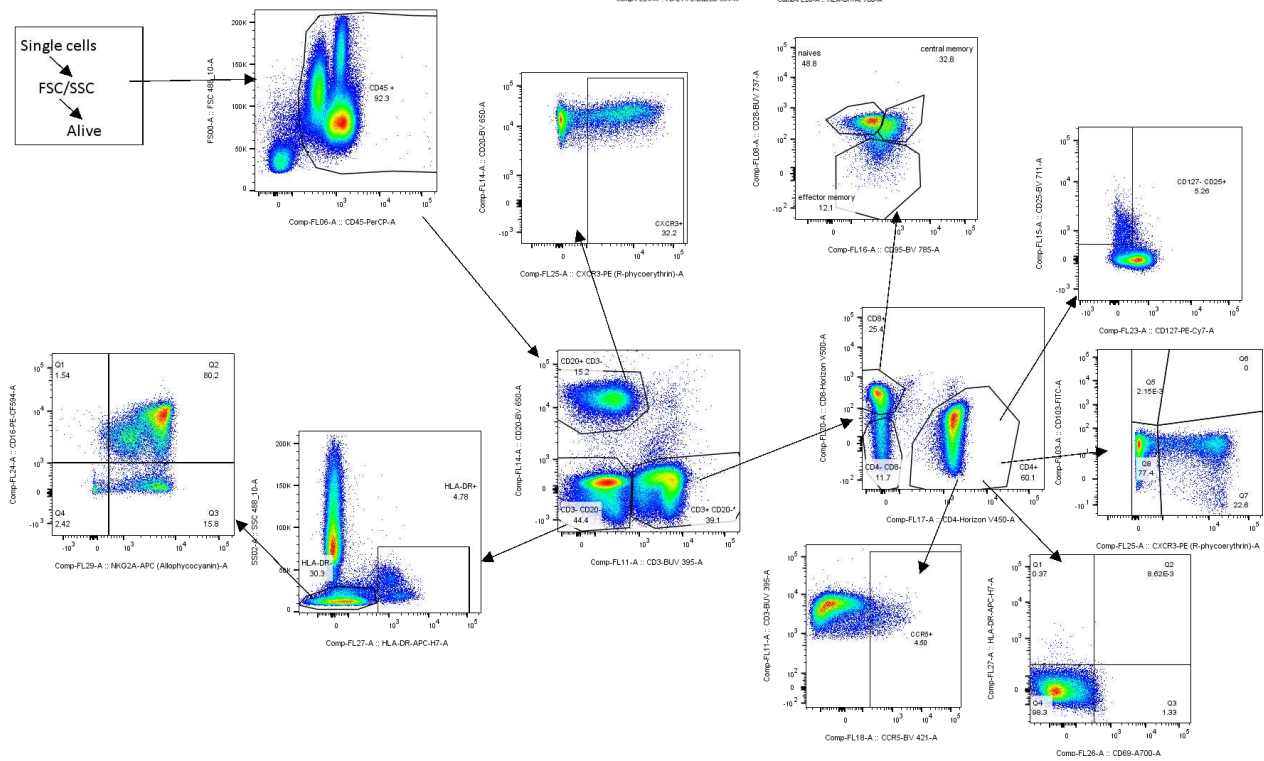


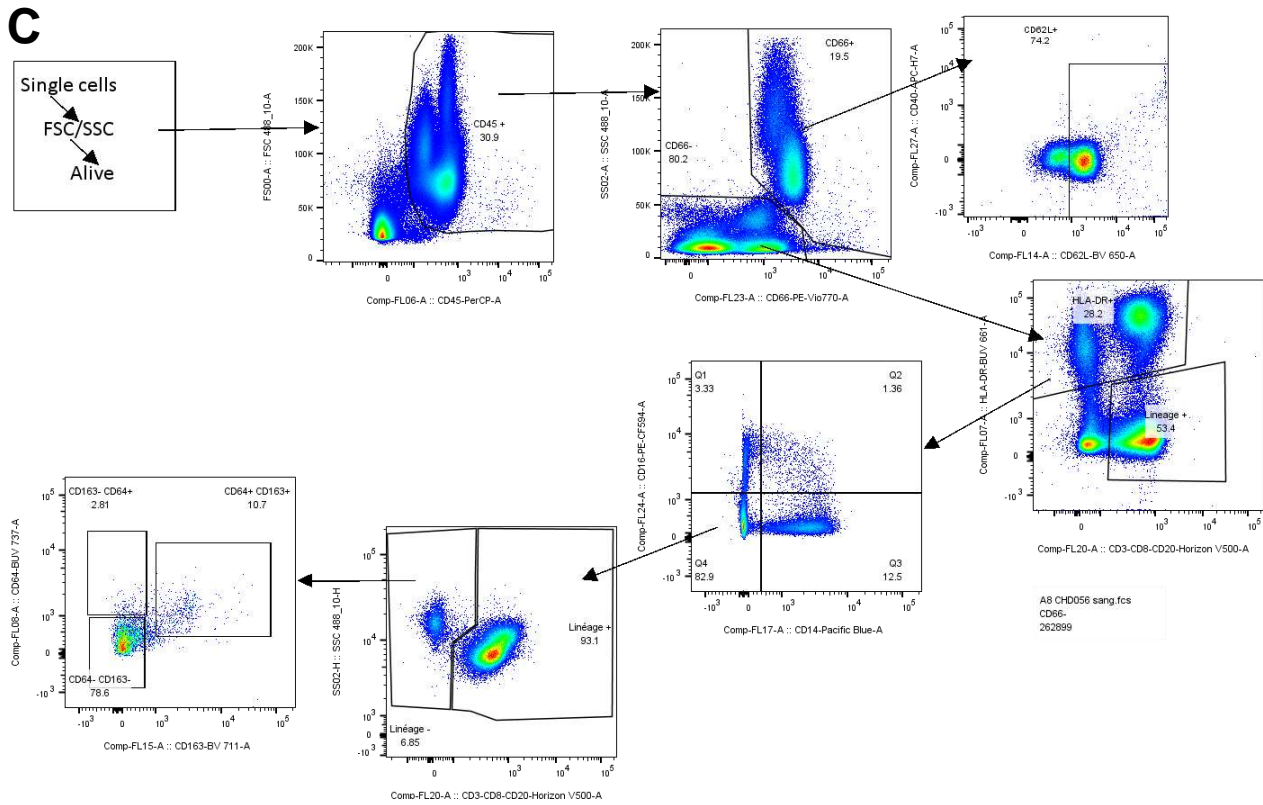
Supplementary Figure 1: Clinical data throughout the study. Clinical data were evaluated for each female during the follow up: (A) High Nugent scores (>7) indicate a vaginal microbiota dysbiosis in most of the animals throughout the study. (B) Vaginal pH was variable but often neutral in all animals throughout the study. Rectal temperature (C) and body weight (D) were stable throughout the study.

A

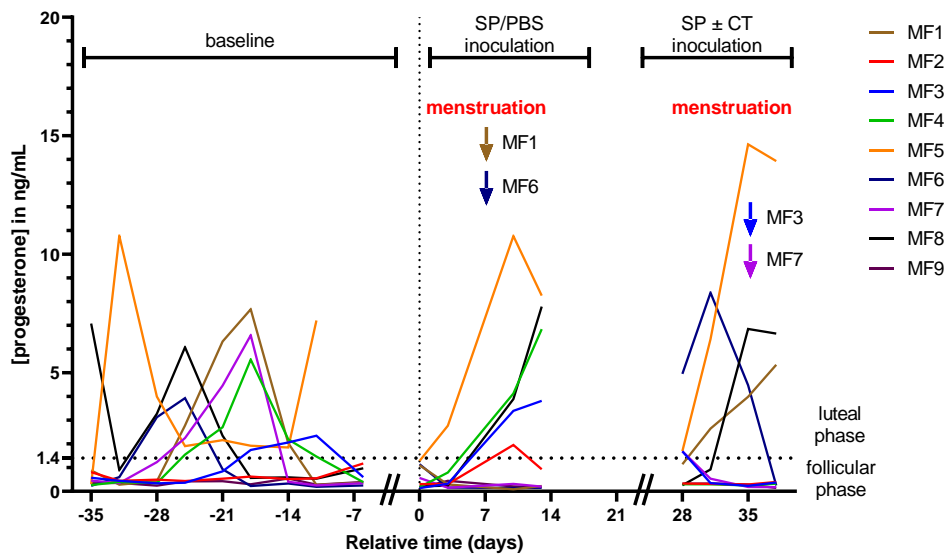


B

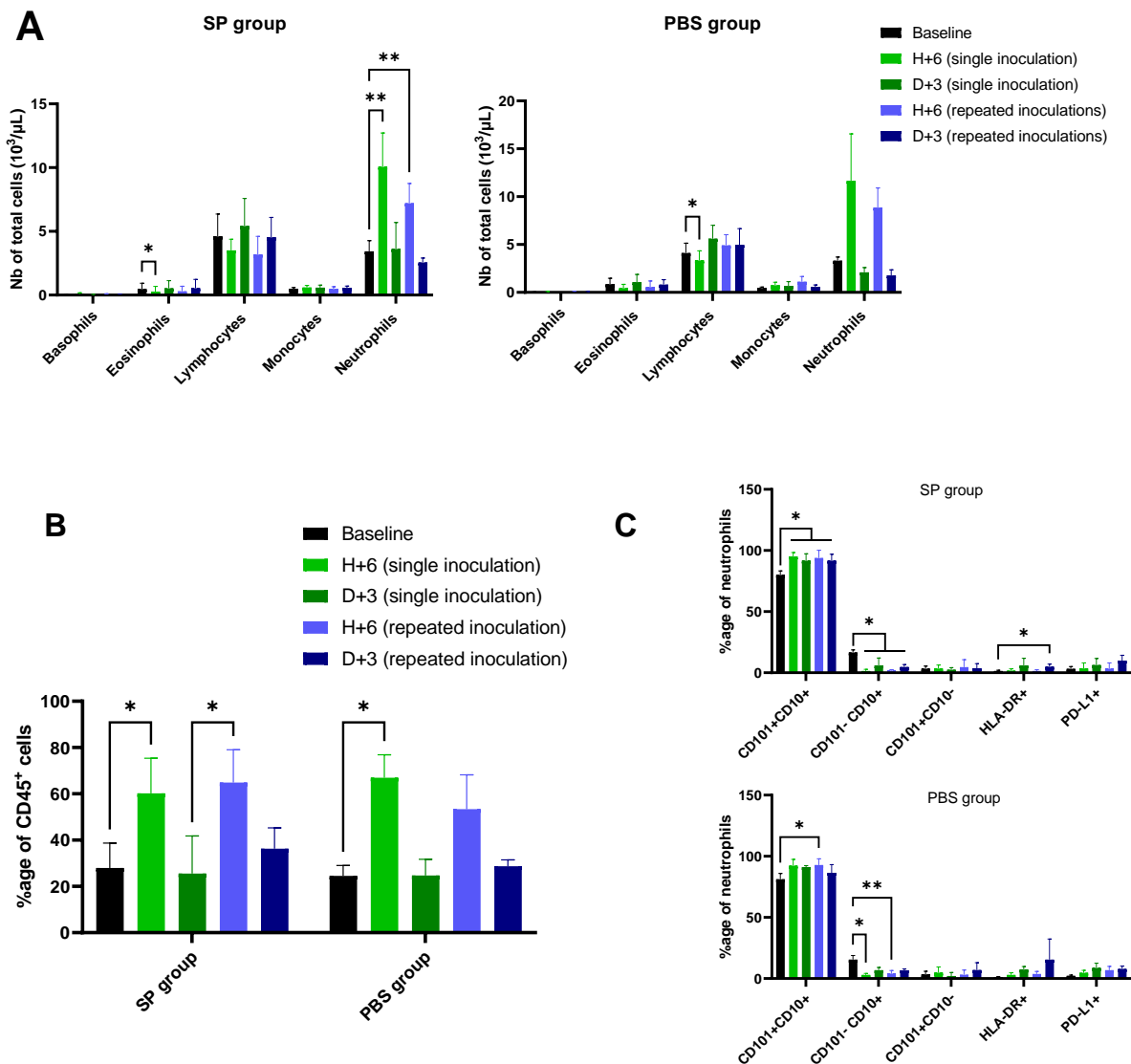




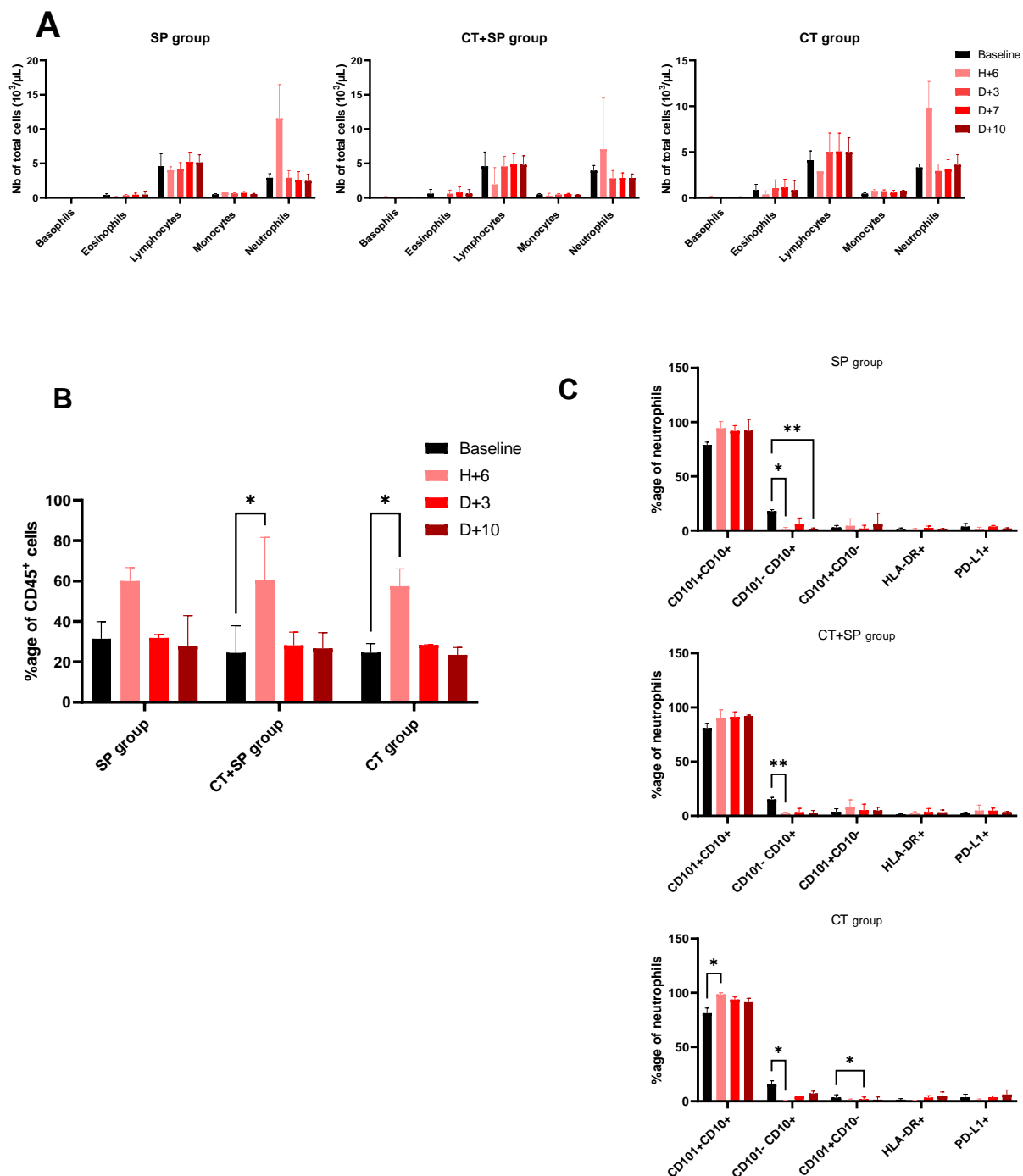
Supplementary Figure 2: FACS gating strategies. The various gating strategies are described in the blood for one representative animal. (A) Gating strategy for neutrophil phenotyping in blood samples. (B) Gating strategy for lymphocyte phenotyping in blood samples. (C) Gating strategy for innate immune cell phenotyping in blood samples.



Supplementary Figure 3: Progesterone quantification. Progesterone was quantified in each animal throughout the study (twice a week at baseline and then once a week). Arrows represent menstruations after baseline.



Supplementary Figure 4: Impact of a single or repeated SP or PBS inoculation(s) on blood immune cells. The immune cells in the blood were analyzed by determination of the Cell Blood Count (A), or by Flow Cytometry (B and C). (A) The number of basophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes and neutrophils is represented in SP (left) and PBS (right) treated animals at H+6 or D+3 post single or repeated inoculation(s). (B) Percentage of blood neutrophils ($CD66^+ Lin_{(CD3, CD8, CD14, CD20, CD123, CDw125)^-}$) among $CD45^+$ cells in SP and PBS treated animals at H+6 or D+3 post single or repeated inoculation(s). (C) Percentage of neutrophil subpopulations among total neutrophils in the SP treated group (top) or PBS treated group (bottom). Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).



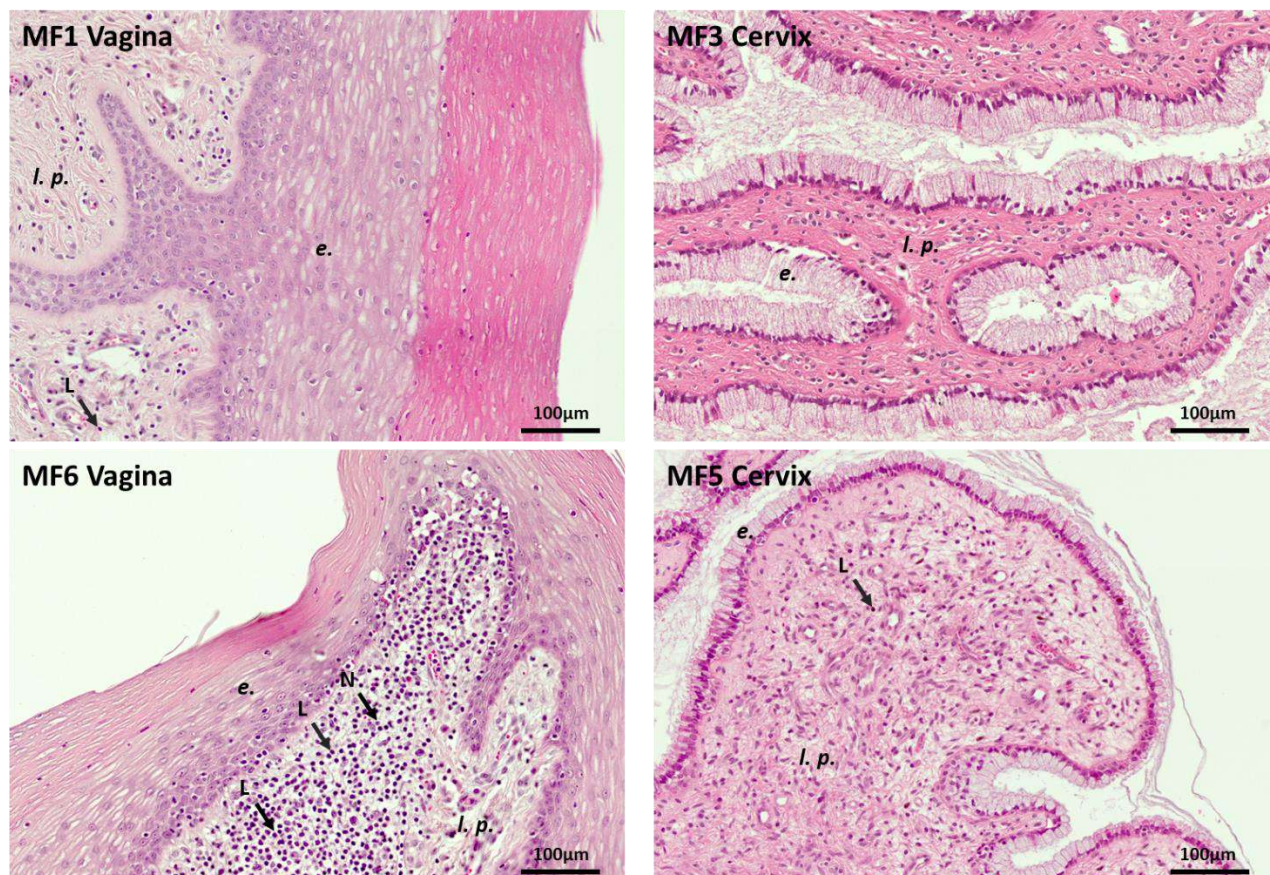
Supplementary Figure 5: Impact of SP and/or CT on blood immune cells. The immune cells in the blood were analyzed by determination of the Cell Blood Count (A), or by Flow Cytometry (B and C). (A) Cell blood count: The number of basophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes and neutrophils is represented in SP, CT+SP and CT treated animals at H+6, D+3, D+7 and D+10 post-inoculation. (B) Percentage of blood neutrophils (CD66⁺ Lin_(CD3, CD8, CD14, CD20, CD123, CDw125)) among CD45⁺ cells in SP, CT+SP and CT treated animals at H+6, D+3, D+7 and D+10 post-inoculation. (C) Percentage of neutrophil subpopulations among total neutrophils in the SP treated group (top), CT+SP treated group (center), or CT treated group (bottom). Asterisks indicate a significant difference by two-way ANOVA test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

A

Group	Animal	Vagina		Cervix		Uterus		Fallopian	
		N	L	N	L	N	L	N	L
SP	MF1	0	+	0	0	+	+	0	+
	MF2	+	+	0	0	+	+	0	+
	MF3	0	++	0	0	0	++	0	0
CT+SP	MF4	0	+	0	0	0	+	0	++
	MF5	+	++	0	++	+	++	0	+
	MF6	++	++	0	+	0	+	0	++
CT	MF7	0	+	0	+	0	+	0	+
	MF8	0	+	0	0	0	+	0	+
	MF9	0	+	0	0	0	+	0	+

Legend 0 Absence N Neutrophils
 + Few L Lymphocytes
 ++ Numerous

B



Supplementary Figure 6: Histological scoring of the neutrophil and leucocyte populations in the different compartments of the FRT at euthanasia. (A) Histological sections were double-blind analyzed by an anatomopathologist that reported the presence or the absence of neutrophils and leucocytes in hematoxylin and eosine stained paraffin sections. (B) Representative images used for the scoring. *e.*, epithelium; *l.p.*, lamina propria; N, neutrophil; L, lymphocyte.

Supplementary Table 1: Clinical data on the female cynomolgus macaques included in the study. The data presented here correspond to the first day of the study.

Group	Animal	Age (year)	Weight (kg)	Haplotype
SP	MF1	3,4	3,76	H1 H1
	MF2	4,5	3,16	Rec H3 H4 H1
	MF3	4,6	3,88	Rec H2 H1 H3
CT+SP	MF4	4,5	4,04	Rec H6 H2 Rec H4 H2
	MF5	4,5	3,9	Rec H1 H5 H2
	MF6	3,2	3,31	H1 Rec H2 H1 H3
CT	MF7	4,5	5,19	H3 Rec H1 H4
	MF8	4,4	4,01	H2 H5
	MF9	3,2	3,2	Rec H1 H4 H7 H2

Supplementary Table 2: Antibody panel used to characterize neutrophil populations.

Antibody	Clone	Label
Bluevid		
CD64	10.1	BUV737
CD14	REA599	Vioblue
CD45	REA1023	viogreen
CD3	SP34.2	BV650
CD123	7G3	
CD8a	RPAT8	
CD20	2H7	
CD62L	SK11	BV711
CD11b	REA713	FITC
CD10	HI10a	PercP-Cy5,5
CDw125	REA705	PE
PD-L1	29E.2A3	PE-Dazzle 594
CD101	REA954	PE-Vio770
CD32a	IV.3	AF647
HLA-DR	L234	AF700
CD66	TET2	APC-vio770

Supplementary Table 3: Antibody panels used to characterize immune cell populations at euthanasia in the compartments of the FRT, iliac, inguinal and axillary LN and blood. The panel (A) was used for lymphocyte phenotyping and the panel (B) for innate immune cell phenotyping.

A

Antibody	Clone	Label
CD3	SP34-2	BUV395
CD45RA	5H9	BUV661
CD28	CD28,2	BUV737
CCR5	3A9	BV421
CD4	L200	V450
CD8	RPA-T8	V500
CD20	2H7	BV650
CD25	2A3	BV711
CD95	DX2	BV786
CD103	Ber-ACT8	FITC
CD45	D058-1283	PerCP
CXCR3	G025H7	PE
CD16	3G8	PE-CF594
CD127	HIL-7R-M21	PE-Cy7
NKG2A	REA110	APC
CD69	FN50	A700
HLA-DR	L243 (G46-6)	APC-H7

B

Antibody	Clone	Label
HLA-DR	L243 (G46-6)	BUV661
CD64	10.1	BUV737
CD86	2331 (FUN-1)	BV421
CD14	M5E2	PacBlue
CD3	SP34-2	V500
CD8	RPA-T8	
CD20	L27	
CD4	L200	BV605
CD62L	SK11	BV650
CD163	GHI/61	BV711
CD80	L307.4	BV786
CD1a	HI149	FITC
CD45	D058-1283	PerCP
CD103	Ber-ACT8	PE
CD16	3G8	PE-CF594
CD123	7G3	APC
CD66	TET2	PE-Vio770
CD11c	3.9	A700
CD40	5C3	APC-H7

4 ETUDE *IN VITRO* DE L'IMPACT DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE VAGINAL SUR L'INFLAMMATION INDUITE PAR CT.

4.1 Introduction et Objectifs

En parallèle de l'étude du rôle du LS sur l'inflammation et la susceptibilité aux IST au niveau du TRF, nous avons étudié le rôle d'un autre composant présent dans l'environnement du TRF : le microbiote vaginal. L'objectif de notre étude était d'évaluer l'impact du microbiote vaginal en termes d'inflammation sur la co-infection CT/VIH-1. Plus précisément, l'étude portait sur *Lactobacillus crispatus* (LC), la bactérie majoritaire des microbiotes vaginaux optimaux chez la femme (moins inflammatoires et plus protecteurs contre les IST) et *Gardnerella vaginalis* (GV), présente dans les microbiotes vaginaux dysbiotiques (plus inflammatoires et favorisant les IST). Nous avons postulé qu'un microbiote vaginal dominé par LC au cours d'une infection par CT est capable de contrer, d'une part l'inflammation induite par l'infection de l'épithélium par CT et, d'autre part l'effet facilitateur sur une autre IST comme le VIH-1. A l'inverse, au cours d'une infection par CT, un microbiote vaginal dominé par GV augmente, d'une part l'inflammation induite par l'infection CT et, d'autre part l'effet facilitateur sur une autre IST. Le premier objectif était de déterminer si LC ou GV modifie l'inflammation dans un contexte d'infection CT. Pour cela, en utilisant le système d'infection *in vitro*, nous avons étudié d'une part l'expression de marqueurs de l'inflammation produits par les cellules épithéliales, et d'autre part le phénotype et les fonctions de neutrophiles. Un deuxième objectif était de déterminer si LC ou GV modifient la susceptibilité à la co-infection VIH-1 dans un contexte d'infection CT. Pour se faire, nous avons étudié l'influence de l'environnement inflammatoire induit par l'infection CT, dans les différentes conditions expérimentales, sur la susceptibilité à l'infection par le VIH-1.

4.2 Matériels et méthodes

Culture bactérienne

Une souche probiotique commercialisée de *L. crispatus* (LC) (Physioflor® LP, Laboratoires IPRAD PHARMA, Paris) et une souche *G. vaginalis* (GV) de l'ATCC (clone ATCC® 14018™) ont été utilisées. LC a été ensemencé sur gélose Man, Rogosa, Sharpe (gélose MRS, Fisher Scientific SAS), à 37°C, 13% CO₂, afin d'obtenir des colonies isolées. Les colonies ont été

cultivées à 37°C, 13% CO₂ en milieu MRS liquide + L-cystéine (0.5 mg/mL, Fisher Scientific SAS). La croissance bactérienne a été suivie au cours du temps par détermination de la densité optique (DO) de la culture à 600 nm. La croissance a été modélisée à l'aide du logiciel Prism (v10, GraphPad) avec un modèle de croissance logistique. En phase exponentielle de croissance (DO = [0.5 ; 0.8]), différentes dilutions de bactéries ont été étalées afin d'établir une équivalence 1 unité de DO = 7,38.10⁷ unités formant colonies (UFC)/mL.

La souche de GV a étéensemencée sur gélose BD *G. vaginalis* (BD Diagnostic Systems, Le Pont de Claix) en conditions anaérobies, afin d'obtenir des colonies isolées. Les colonies ont été cultivées à 37°C, 13% CO₂ en milieu Brain Heart Infusion (BHI, SIGMA ALDRICH CHIMIE) liquide enrichi en glucose + L-cystéine (0.5 mg/mL). La croissance bactérienne a été suivie au cours du temps par détermination de la densité optique (DO) de la culture à 600 nm. La croissance a été modélisée à l'aide du logiciel Prism (v10, GraphPad) avec un modèle de croissance logistique. En phase exponentielle de croissance (DO = [0.5 ; 0.8]), différentes dilutions de bactéries ont été étalées afin d'établir une équivalence 1 unité de DO = 4,52.10⁸ unités formant colonies (UFC)/mL.

Infection par *C. trachomatis* des cellules A2EN en présence ou non de bactéries du microbiote vaginal

Les cellules épithéliales endocervicales humaines (A2EN), décrites dans l'article 1 « Seminal plasma inhibits *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*, and may have consequences on mucosal immunity », ont été utilisées pour réaliser les infections CT (souche svD UW3/Cx, obtenue de l'équipe de Franck Follmann, Danemark) *in vitro*, en présence ou non de LC ou de GV (Figure 27).

Les cellules A2EN ont étéensemencées à 0.5.10⁵ cellules par puits en plaque 24 puits dans 1 mL de milieu Epilife complet (1% Pénicilline/Streptomycine (PS) + 60 µM CaCl₂). Quatre jours plus tard, le milieu des cellules A2EN a été retiré, les cellules ont été lavées puis reprises dans 1 mL de milieu Epilife en absence de PS, contenant ou non du poly(I:C) HMW (100 µg/mL), ou *Chlamydia trachomatis* (CT) sérovar D à une MOI de 12. Les cellules A2EN ont alors été centrifugées (1 h à 700 g) afin de faciliter l'entrée de CT dans les cellules.

Par ailleurs, une culture *overnight* de LC ou GV a été diluée au 1/100. En phase exponentielle de croissance, 5 mL de culture bactérienne ont été centrifugés (5 min à 16 200 g), les

bactéries ont été lavées et reprises en milieu DMEM + 10% SVF. Une heure après stimulation des cellules A2EN dans les différentes conditions, les cellules A2EN ont été lavées puis reprises en milieu DMEM seul, ou contenant LC ou GV à une MOI de 50, préparées comme décrit ci-dessus. Après 24h, les surnageants (SN) de cultures ont été récoltés et filtrés, la viabilité des cellules épithéliales a été évaluée à l'aide du kit *CellTiter*[®]. Les cellules ont ensuite été fixées en PFA 4%, et le pourcentage d'infection a été déterminé en comptant le nombre de cellules infectées en microscopie optique, grossissement 40X (Axiovert 25, Zeiss). La concentration en cytokines a été quantifiée par Luminex[®], comme décrit dans l'article 1 « Seminal plasma inhibits *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*, and may have consequences on mucosal immunity ».

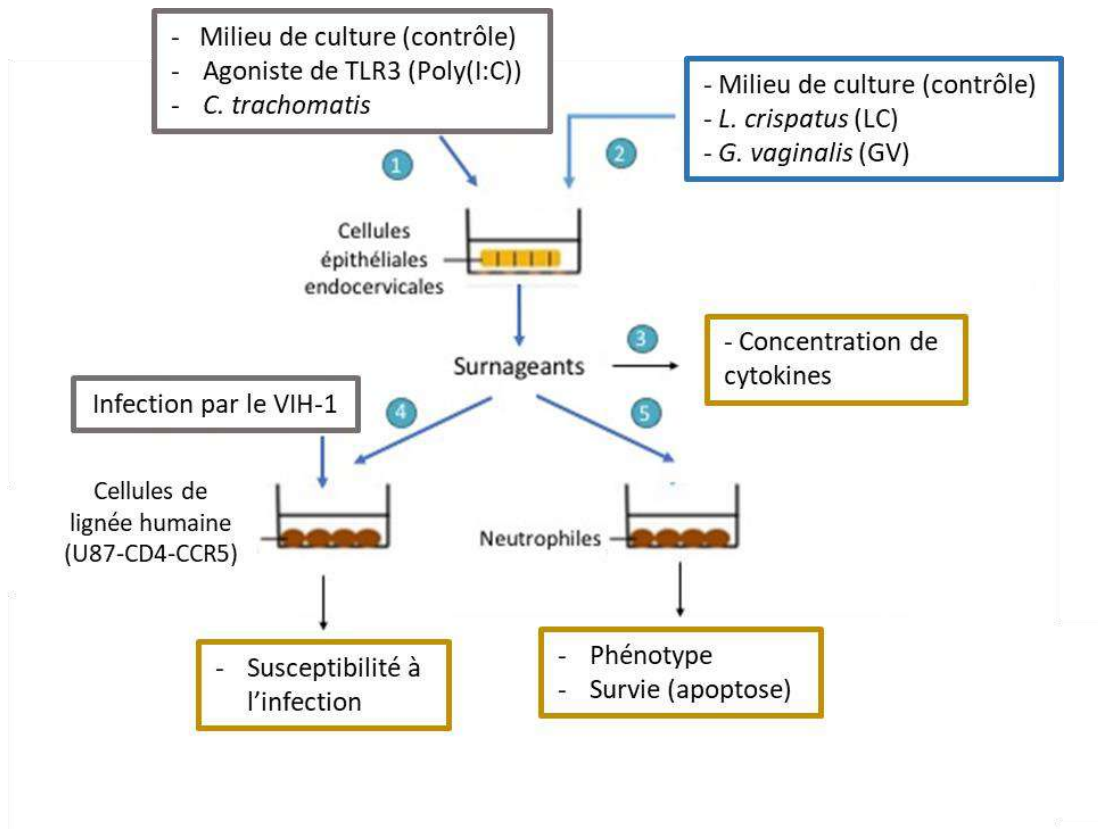


Figure 27 : Schéma du modèle expérimental *in vitro*. Des cellules épithéliales endocervicales (cellules A2EN) ont été infectées ou non par CT et exposées ou non à LC ou GV. Les surnageants (SN) des différentes conditions ont été récupérés et leur profil cytokinique a été caractérisé. Les SN ont ensuite été déposés d'une part sur des neutrophiles, puis leur phénotype et leur survie ont été étudiés. D'autre part, les SN ont été déposés sur des cellules (U87-CD4⁺-CCR5⁺) infectées par des pseudotypes viraux. Dans les différentes conditions expérimentales, l'efficacité de la transduction virale a été quantifiée via l'expression du gène rapporteur de la luciférase.

Phénotype et fonction des neutrophiles en présence de surnageants de culture des cellules A2EN

Les analyses phénotypiques et fonctionnelles sur les neutrophiles humains isolés à l'aide du kit EasySep Direct Human Neutrophil Isolation Kit (StemCell Tech, Vancouver) ont été réalisées comme celles indiquées dans l'article 1 « Seminal plasma inhibits *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*, and may have consequences on mucosal immunity », mais en utilisant les surnageants des cellules A2EN mis en présence ou non de CT, de LC ou de GV (Figure 27).

Infection de cellules susceptibles au VIH-1 en présence de surnageants de culture des cellules A2EN

Les cellules U87-CD4⁺-CCR5⁺ sont des cellules isolées d'un astrocytome de glioblastome humain transduites avec les vecteurs MV7neo-T4 et pBABE-puro-CCR5, puis sélectionnées pour la résistance à la puromycine et au G418 (Sigma-Aldrich). L'infection des cellules de lignée humaine U87-CD4⁺-CCR5⁺, a été réalisée en utilisant des virus pseudotypés avec l'enveloppe BaL du VIH-1 (VIH-1_{BaL}-Luc) ou la protéine G du VSV (VSV-G-Luc) et exprimant le gène rapporteur de la luciférase. Les pseudotypes ont été préparés en co-transfectant des cellules 293T avec le plasmide pNL-Luc E2R2 (codant le virus backbone) et les plasmides codant les enveloppes des virus. 2.10⁵ cellules U87 ont été incubées 2 h à 37°C, 5% de CO₂, avec 100 µL de RMPI complet + 100 µL de DMEM, ou 100 µL de SN des cellules A2EN dans les différentes conditions (Figure 27). Ensuite, les cellules ont été mises en contact de 2.5ng de VIH-1_{BaL}-Luc ou 62.5pg de VSV-G-Luc. Après spinoculation (30min, 2000rpm), les cellules ont été lavées, puis reprises dans 100 µL de RMPI complet + 100 µL SN des cellules A2EN dans les différentes conditions. Les cellules ont été lysées après 48h, et l'efficacité de transduction a été évaluée par suivi de la luminescence dans les lysats (kit Luciferase Assay Systems, Promega) et du lecteur de microplaques multimodal (Spark 10M, TECAN ; Suisse). Des essais d'infection ont également été réalisés sur PBMC humains et des cellules isolées du TRF humain, en utilisant une souche de VIH-1_{BaL} (tropisme R5) et en quantifiant la concentration virale à l'aide d'un kit ELISA p24 (HIV-1 p24 Extended Range ELISA Assay, XpressBio).

4.3 Résultats

Infection des cellules A2EN par CT en présence des bactéries du microbiote vaginal et analyse de l'expression des cytokines

Les résultats décrits dans cette partie ont été obtenus en collaboration avec C. Adapen, une doctorante de notre équipe. Les cellules A2EN ont été infectées, ou non, par CT, en présence, ou non, de LC ou GV. Leur production de cytokines a été comparée au contrôle non infecté. La concentration de différentes cytokines est élevée au niveau basal (IL-8, IL-6, IL-1RA), alors que d'autres (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-17, CCL5, CCL11, CXCL10, IFN- α , IFN- γ et TNF- α) sont peu ou pas exprimées (Figure 28A). La stimulation des cellules A2EN par un agoniste de TLR3 (poly(I:C)) entraîne une augmentation de la concentration de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, CCL3, CCL5 et CXCL10), ce qui montre que les cellules sont capables de répondre à une stimulation (Figure 28B, C).

Dans les conditions où les cellules A2EN ont été exposées à CT, le pourcentage d'infection a été déterminé par microscopie optique (Figure 29).

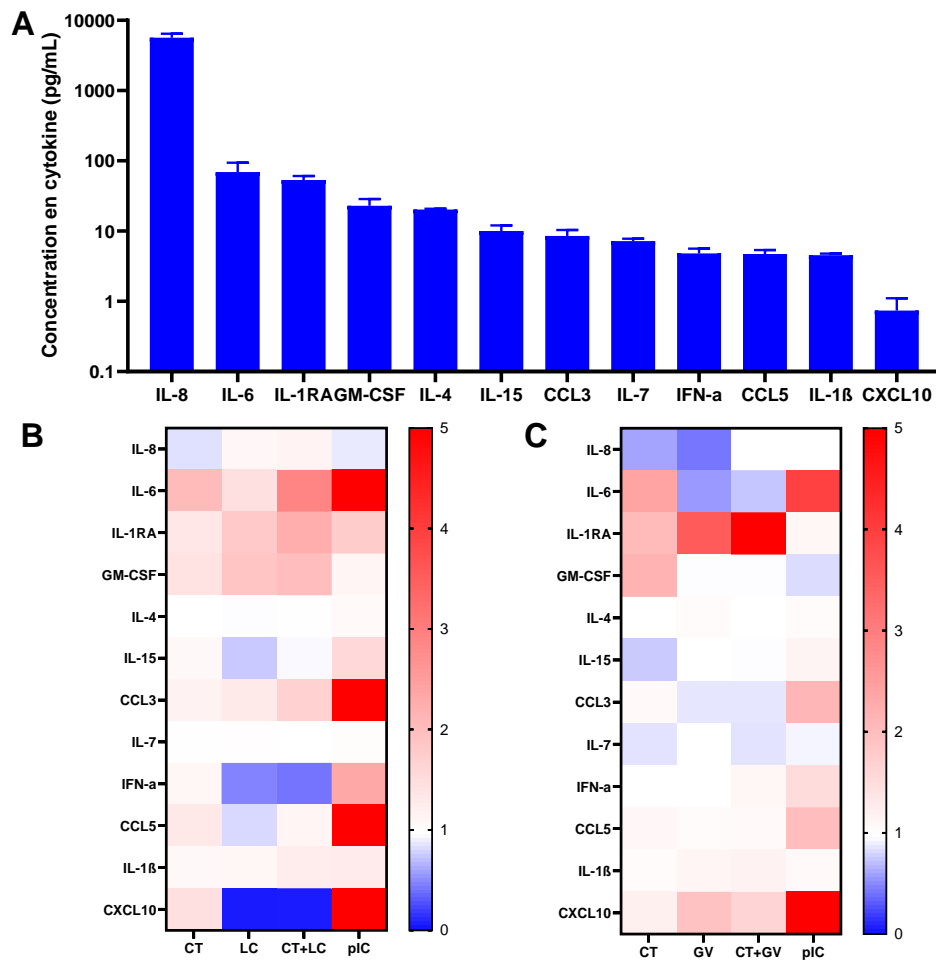


Figure 28 : Expression des cytokines par les cellules A2EN. (A) Moyenne des concentrations basales de cytokines mesurées par Luminex® dans les surnageants de culture, après 24 h de culture (n=7). (B et C) Les variations de concentration de cytokines sont représentées par rapport à la condition non infectée, et sans bactéries du microbiote vaginal (NI). Le poly(I:C) (pIC) est utilisé comme contrôle positif de la stimulation des cellules A2EN. L'effet de LC et GV, seul ou en présence de CT, est représenté en (B) et en (C), respectivement (n=4 pour chaque panel).

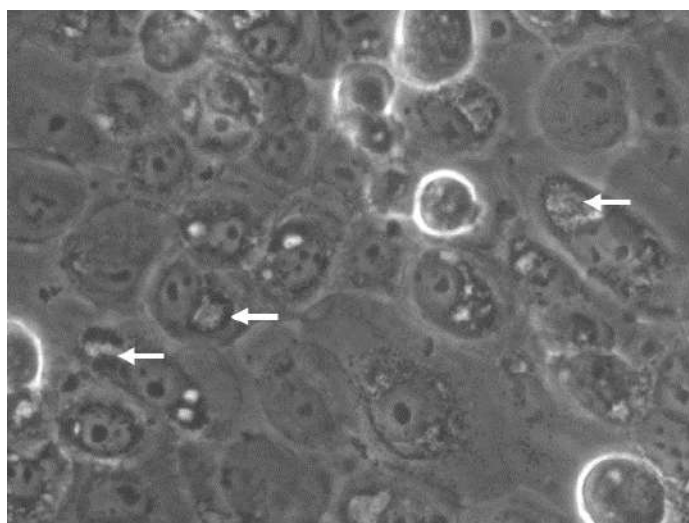


Figure 29 : Cellules A2EN infectées par *C. trachomatis* (CT). Les cellules A2EN ont été exposées 1 h à CT (à une MOI de 12) puis cultivées 24 h. Les cellules sont observées à l'objectif 40X, en microscopie optique à contraste de phase. Les inclusions sont représentées par des flèches blanches.

Le pourcentage de cellules A2EN infectées CT à 24h post-infection était de $28\% \pm 6\%$. L'infection CT entraîne une modification de la production de cytokines par rapport aux cellules non infectées (Figure 28B, C). Les concentrations de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1RA, CXCL10, CCL5 et GM-CSF) augmentent à 24 hpi par rapport à la condition NI. Dans un second temps, nous avons cherché à savoir si la présence des bactéries du microbiote vaginal (LC ou GV) affectait l'infection des cellules A2EN par CT. Dans ces conditions, l'activité métabolique des bactéries, et notamment des LC, peut affecter le pH du milieu (production d'acide lactique), et pourrait altérer la viabilité cellulaire.

Nous avons donc déterminé dans toutes les conditions le pH des surnageants et la viabilité des cellules A2EN. Bien que la présence de LC entraîne une diminution de pH par rapport à la culture A2EN seule, il reste proche de la neutralité (Tableau 5).

Concernant la viabilité des cellules A2EN, elle n'est pas diminuée de manière significative avec LC dans les différentes conditions expérimentales (Tableau 5).

Tableau 5 : Viabilité des cellules A2EN et valeur de pH des surnageants des cellules dans les différentes conditions expérimentales après 24 h de culture (n=4).

	NI	CT	LC	CT + LC	GV	CT + GV	Poly(I:C)
pH du SN	$7,1 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,4$
% survie (réf : NI)	100% ± 0%	86% ± 7%	135% ± 7%	132% ± 7%	119% ± 5%	91% ± 17%	91% ± 12%

La coculture des cellules A2EN avec LC induit une diminution de la production d'IFN- α , CCL5, IL-15 et CXCL10 et une faible augmentation d'IL-1RA, IL-6, CCL3 et GM-CSF (Figure 28B). A l'inverse, la coculture des cellules A2EN avec GV induit une diminution de la production d'IL-6, IL-8 et CCL3 et une augmentation d'IL-1RA et CXCL10 (Figure 28B). De manière générale, le profil de cytokines exprimé par les cellules A2EN montre que LC et GV ont un effet distinct et potentiellement régulateur de l'inflammation.

Les cellules A2EN infectées par CT, puis mises en présence de bactéries du microbiote vaginal présentent le même profil cytokinique que la condition simple coculture A2EN/bactéries du microbiote vaginal. Dans les cellules infectées par CT, les différentes bactéries pourraient donc avoir un effet additif sur la production de la majorité des cytokines. En revanche, pour l'IL-1RA, l'effet semble plutôt être synergique puisque la présence de CT + LC ou GV entraîne une plus forte production que lorsque les cellules A2EN sont mises en présence d'une seule bactérie (CT, LC ou GV).

En conclusion, les bactéries du microbiote vaginal semblent restaurer, dans les cellules infectées par CT, le niveau d'inflammation des cellules non infectées et contrecarrer l'expression de la majorité des cytokines induite par l'infection CT. En revanche les bactéries du microbiote vaginal potentialisent l'expression d'IL-1RA induite lors de l'infection CT.

Impact des surnageants des cellules A2EN sur le phénotype et la survie de neutrophiles

Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées sur le site de l'inflammation, notamment lors d'une infection par CT. Nous avons donc voulu voir si les variations des concentrations de cytokines induites par la présence des bactéries du microbiote vaginal au cours d'une infection CT pouvaient avoir un impact sur le phénotype et la survie des neutrophiles. Pour se faire, des neutrophiles isolés du sang périphérique humain ont été mis en contact des SN des cellules A2EN, et leur phénotype a été déterminé et comparé après 0h et 6h d'interaction (Figure 30).

Dans le milieu DMEM (ne contenant pas de cytokines), le phénotype des neutrophiles est comparable entre 0h et 6h après isolement, sauf pour CD10, CD62L et dans une moindre mesure CD101, dont l'expression diminue (Figure 30B, C et D). Les surnageants de cellules A2EN non infectées ont un effet sur le phénotype des neutrophiles après 6h de culture : ils

augmentent de manière significative l'expression de CD11b, CD10, CD62L, CD101 et CD32a. L'augmentation de CD11b et CD32a reflète une activation des neutrophiles, alors que CD10 et CD101 sont exprimés sur les neutrophiles matures dans le sang, suggérant que les surnageants A2EN induisent une maturation des neutrophiles. L'augmentation de CD62L indique une augmentation de la capacité d'adhésion des neutrophiles. Les SN des cellules A2EN au contact de bactéries du microbiote vaginal diminuent l'expression de CD62L, et donc la capacité d'adhésion des neutrophiles. LC semble avoir un effet différent de GV, puisque les neutrophiles au contact des SN de cellules A2EN en présence de LC expriment plus CD11b et moins CD10. Cependant aucune autre différence n'est observée quant aux autres marqueurs d'activation ou de maturation (CD32a et CD101). Les différences décrites ci-dessus n'ont pas pu être attribuées à une composition spécifique de cytokines dans les surnageants de cellules A2EN.

En conclusion, dans toutes les conditions expérimentales testées, les surnageants des cellules A2EN augmentent l'expression de plusieurs marqueurs d'activation et de maturation dans les neutrophiles issus du sang périphérique. Le contact des bactéries du microbiote vaginal avec les cellules épithéliales a un effet au niveau de l'environnement, qui réduit la capacité d'adhésion des neutrophiles. D'autre part la présence de LC pourrait avoir un effet supplémentaire sur l'activation des neutrophiles.

Dans le milieu DMEM (ne contenant pas de cytokines), le phénotype des neutrophiles est comparable entre 0h et 6h après isolement, sauf pour CD10, CD62L et dans une moindre mesure CD101, dont l'expression diminue (Figure 30B, C et D).

Les surnageants de cellules A2EN non infectées ont un effet sur le phénotype des neutrophiles après 6h de culture : ils augmentent de manière significative l'expression de CD11b, CD10, CD62L, CD101 et CD32a. L'augmentation de CD11b et CD32a reflète une activation des neutrophiles, alors que CD10 et CD101 sont exprimés sur les neutrophiles matures dans le sang, suggérant que les surnageants A2EN induisent une maturation des neutrophiles. L'augmentation de CD62L indique une augmentation de la capacité d'adhésion des neutrophiles. Les SN des cellules A2EN au contact de bactéries du microbiote vaginal diminuent l'expression de CD62L, et donc la capacité d'adhésion des neutrophiles.

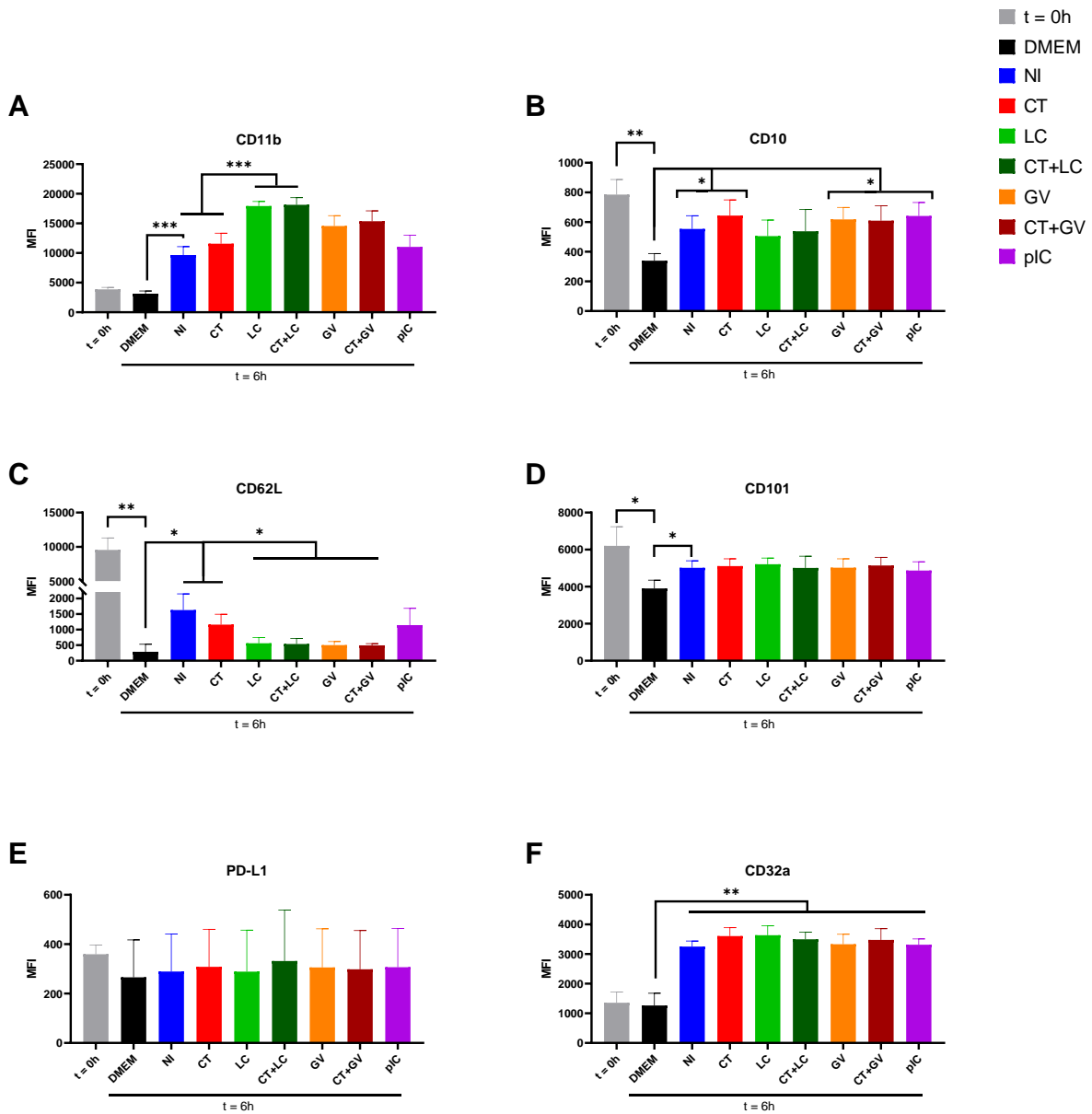


Figure 30 : Impact des surnageants de culture des cellules A2EN sur le phénotype des neutrophiles issus du sang périphérique. Des neutrophiles ont été isolés du sang périphérique, et leur phénotype a été étudié, directement après le tri (t=0h), ou après 6h d'incubation avec du surnageant de culture des cellules A2EN dans les différentes conditions expérimentales. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de CD11b (A), CD10 (B), CD62L (C), CD101 (D), PD-L1 (E) et CD32a (F) des neutrophiles est représentée (n=4). Les astérisques représentent une différence significative après analyse par ANOVA univariée avec la correction de Tukey pour les comparaisons multiples (*p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001).

LC semble avoir un effet différent de GV, puisque les neutrophiles au contact des SN de cellules A2EN en présence de LC expriment plus CD11b et moins CD10. Cependant aucune

autre différence n'est observée quant aux autres marqueurs d'activation ou de maturation (CD32a et CD101). Les différences décrites ci-dessus n'ont pas pu être attribuées à une composition spécifique de cytokines dans les surnageants de cellules A2EN. En conclusion, dans toutes les conditions expérimentales testées, les surnageants des cellules A2EN augmentent l'expression de plusieurs marqueurs d'activation et de maturation dans les neutrophiles issus du sang périphérique. Le contact des bactéries du microbiote vaginal avec les cellules épithéliales a un effet au niveau de l'environnement, qui réduit la capacité d'adhésion des neutrophiles. D'autre part la présence de LC pourrait avoir un effet supplémentaire sur l'activation des neutrophiles.

Par ailleurs, la survie des neutrophiles a été évaluée à 2h, 6h, 24h et 48h après la mise en contact des SN de cellules A2EN avec les neutrophiles (Figure 31). En milieu DMEM (sans cytokines), la survie des neutrophiles est drastiquement réduite dès 6h post-tri et continue de diminuer à 24h, avec respectivement 61% et 19% de survie cellulaire. En revanche, les surnageants des cellules A2EN ont maintenu la survie des neutrophiles après 6 h de culture ($p < 0,01$), avec au moins 93 % de survie cellulaire à 6 h et 45 % à 24 h respectivement. Après 24h de culture, les différents surnageants de cellules A2EN testés n'ont pas d'effet significativement différents sur la survie des neutrophiles. Cependant, dans les conditions où les cellules A2EN sont mis en contact de GV, on constate l'apparition d'une population AnV⁻ 7-AAD⁺, considérée comme nécrotique. Cette population est visible dès 24h post-incubation, mais l'augmentation de la quantité de cellules nécrotiques (7-AAD⁺) n'est significative qu'après 48h d'incubation. En conclusion, dans toutes les conditions expérimentales testées, les surnageants des cellules A2EN augmentent la survie des neutrophiles issus du sang périphérique par rapport au milieu DMEM. Par contre, les surnageants des cellules A2EN traitées avec GV entraînent une surmortalité des neutrophiles.

Impact des surnageants de culture des cellules A2EN sur l'infection par le VIH-1

La présence d'une IST, et notamment de CT, peut entraîner une augmentation du risque d'acquisition d'autres IST, particulièrement du VIH-1. Nous avons montré *in vitro* que le microbiote vaginal module l'inflammation induite par l'infection CT et pourrait donc modifier la susceptibilité à l'infection par le VIH-1, puisque l'inflammation est un paramètre

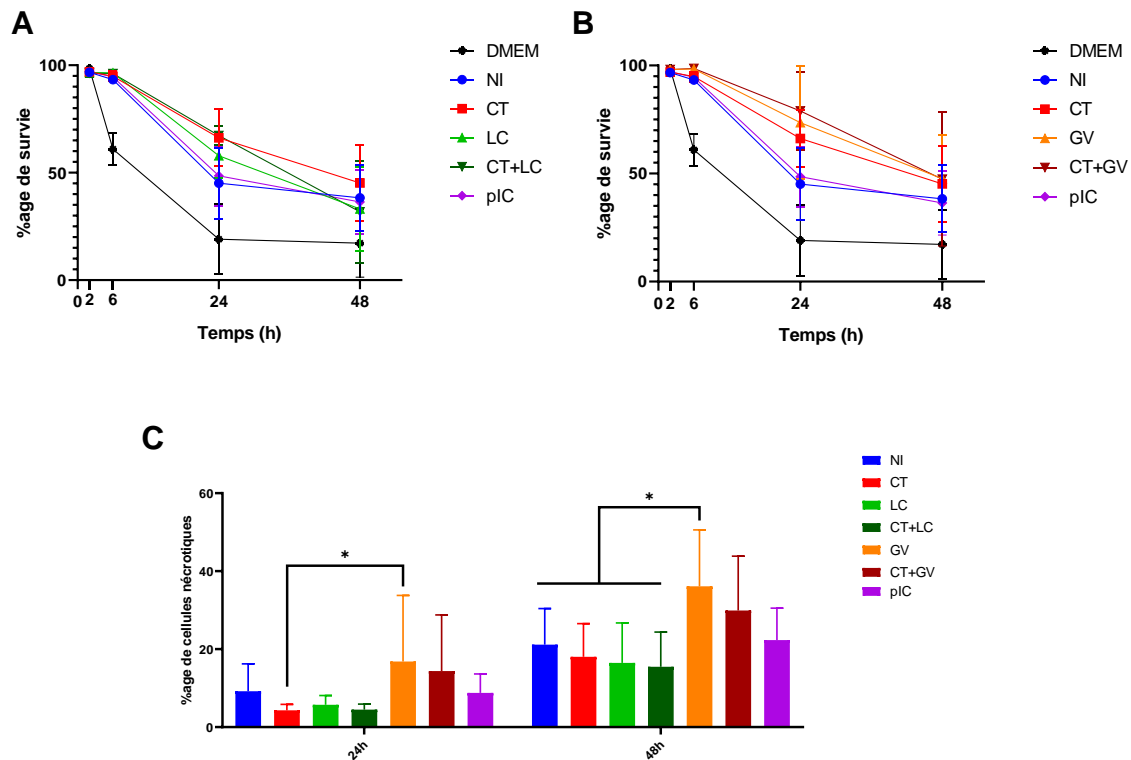


Figure 31 : Impact des surnageants de culture des cellules A2EN sur la survie des neutrophiles issus du sang périphérique. La survie des neutrophiles isolés du sang a été étudiée de 2h à 48h après incubation avec du surnageant de culture des cellules A2EN dans les différentes conditions expérimentales (n=4). Les cellules vivantes (AnV⁻ 7-AAD⁻) ou nécrotiques (7-AAD⁺) ont été quantifiées parmi les neutrophiles. (A et B) Évolution de la survie des neutrophiles dans le temps. (A) Effet de LC. (B) Effet de GV. (C) Pourcentage de neutrophiles nécrotiques après 24h ou 48h d'incubation. Les astérisques représentent une différence significative après analyse par ANOVA univariée avec la correction de Tukey pour les comparaisons multiples (*p≤0.05).

déterminant pour la modulation de l'infection. Nous avons donc voulu tester si les surnageants des cellules A2EN infectées par CT en présence ou non des bactéries du microbiote vaginal pouvaient avoir un impact sur la susceptibilité à l'infection par le VIH-1. Des cellules U87-CD4⁺-CCR5⁺ ont été incubées avec les surnageants des cellules A2EN dans les différentes conditions, puis mises en présence de pseudotypes viraux (VIH-1_{BaL}-Luc ou VSV-G-Luc). Après 48h, les cellules ont été lysées afin de quantifier l'expression de la luciférase, gène rapporteur de l'efficacité des étapes précoces de la réplication virale. Après addition du substrat de la luciférase, la luminescence a été évaluée et est rapportée Figure 32. Quel que soit le pseudotype utilisé, les surnageants des cellules A2EN stimulées par le poly(I:C) entraîne une diminution de l'efficacité de la transduction. En revanche, les

surnageants des cellules A2EN ont peu d'effet sur l'efficacité de la transduction. Seuls les surnageants des cellules A2EN au contact de GV entraînent une diminution de l'efficacité de la transduction des deux pseudotypes testés (VIH-1_{BaL}-Luc ou VSV-G-Luc). En conclusion, dans ces conditions expérimentales, la présence de GV pourrait favoriser une diminution de la susceptibilité au VIH-1.

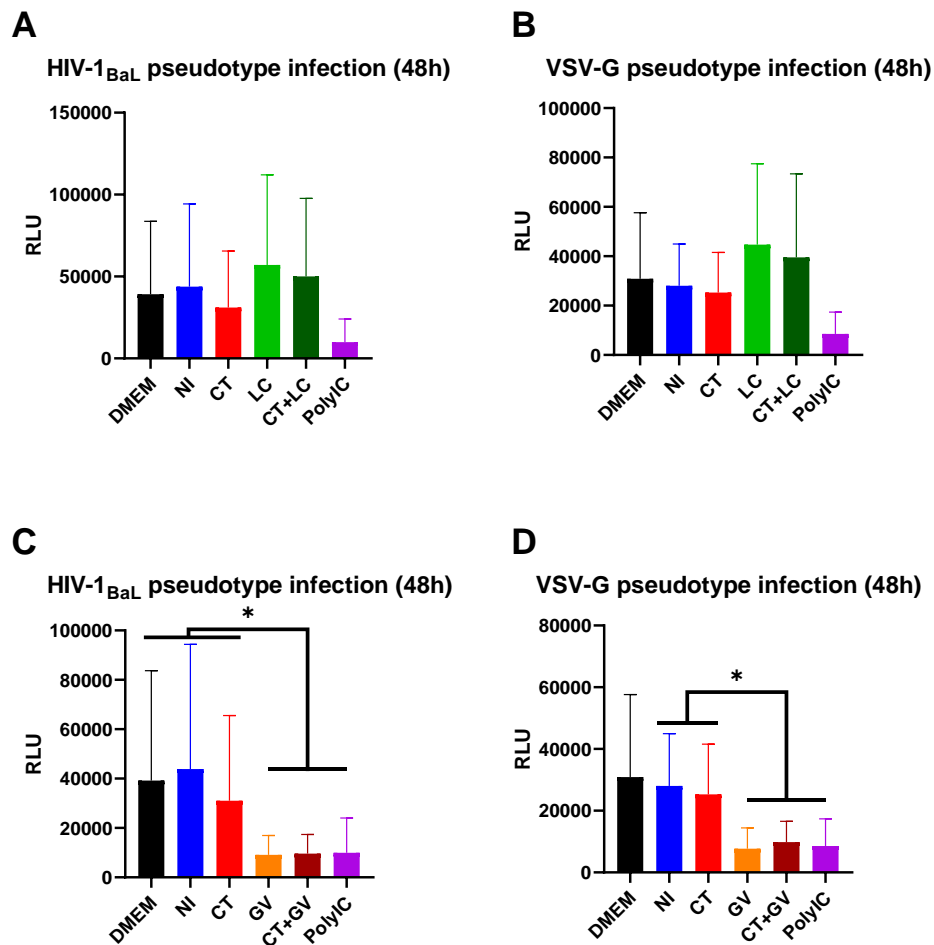


Figure 32 : Impact des surnageants des cellules A2EN sur la transduction du VIH-1. Des cellules U87-CD4⁺-CCR5⁺ ont été traitées 2h par les surnageants de cellules A2EN dans différentes conditions, puis mises en contact avec des pseudotypes viraux : VIH-1_{BaL}-Luc (A et C) ou VSV-G-Luc (B et D). Après 48h, les cellules sont lysées et la transduction est évaluée en comparant l'activité enzymatique de la luciférase dans les différentes conditions (n=3, en triplicats). (A et B) Effet de LC. (C et D) Effet de GV. Les astérisques représentent une différence significative après analyse par ANOVA univariée avec la correction de Tukey pour les comparaisons multiples (*p≤0.05)

4.4 Discussion

De nombreuses données épidémiologiques existent concernant le rôle de l'inflammation, des co-infections et du microbiote dans l'établissement des IST. Les études associent la présence d'agents causant des IST ou des états de dysbioses tels que la vaginose bactérienne à une augmentation du risque d'acquisition d'IST, médiée notamment par une augmentation de l'inflammation génitale. Les mécanismes sous-jacents sont en revanche souvent peu ou pas documentés, particulièrement dans le cadre des co-infections. Au cours de cette étude, nous avons mis en place un modèle *in vitro* visant à mieux comprendre le rôle du microbiote et de l'environnement muqueux (en termes d'inflammation) dans l'établissement des co-infections CT/VIH-1.

Nous avons pu vérifier que les cellules A2EN mises en présence de CT produisent des cytokines pro-inflammatoires. Cette production de cytokines variait dans le temps et en fonction de la MOI utilisée (C. Adapen, manuscrit de thèse). Ainsi, une forte MOI induisait un pourcentage d'infection élevé et une production de cytokines pro-inflammatoires à 24 hpi, mais plus faible par rapport à celle induite par un agoniste de TLR3 (poly(I:C)). Les lactobacilles sont capables d'interférer avec les IST au niveau du TRF (compétition avec les pathogènes, production de métabolites antimicrobiens, stimulation du système immunitaire...) ⁴⁷²⁻⁴⁷⁴. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas toujours connus, notamment concernant les niveaux d'inflammation. Par ailleurs, lorsque les IST sont établies, l'inflammation génitale augmente et le microbiote vaginal évolue souvent vers un état de dysbiose (caractérisé par exemple par une forte abondance de GV), qui entretient l'inflammation. Dans le modèle *in vitro*, les bactéries du microbiote ont été rajoutées aux cellules A2EN une fois ces dernières infectées et nous pouvons ainsi mettre en évidence l'effet des bactéries sur les phases tardives de l'infection. L'étude de la coculture des cellules A2EN infectées ou non avec des bactéries du microbiote vaginal nous a permis d'observer un profil caractéristique d'un contexte anti-inflammatoire après 24 h de coculture entre cellules A2EN et LC, et la coculture entre cellules A2EN et GV induisait un environnement distinct. Les variations de production des cytokines dues aux bactéries du microbiote vaginal pourraient être induites via des antigènes microbiens, ou bien via des métabolites produits

par ces bactéries (acide lactique, H_2O_2 , acides gras à chaîne courte, bactériocines, ...) ^{61,475}. Une expérience complémentaire (Figure 33) de coculture des cellules A2EN avec des LC inactivées à la chaleur a montré que les variations de cytokines induites par l'interaction étaient moindres par rapport à celles induites par les bactéries vivantes. Ceci indique que la viabilité de LC est nécessaire pour induire une forte production de cytokines par les cellules A2EN, ce qui pourrait impliquer qu'elles produisent différents métabolites auxquelles les cellules A2EN répondent par une production de cytokines.

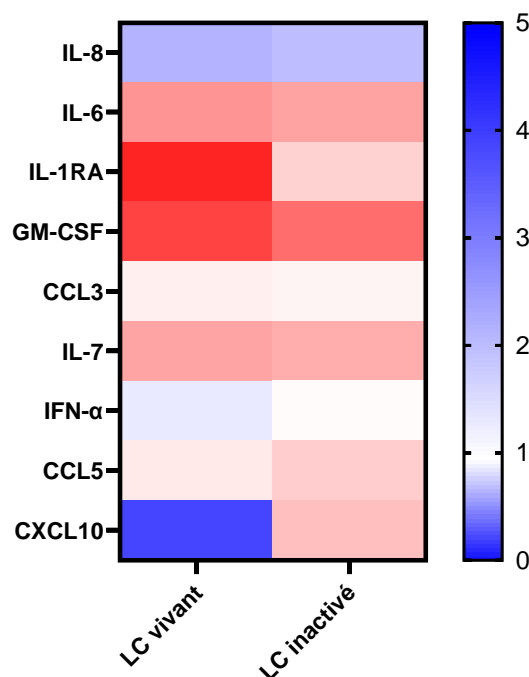


Figure 33 : Effet de *L. crispatus* vivant ou inactivé sur les cellules A2EN. Des cellules épithéliales endocervicales (cellules A2EN) ont été exposées 2h ou non à LC, vivant ou inactivé à la chaleur (20 min à 70°C). Les surnageants (SN) des différentes conditions ont été récupérés et leur profil cytokinique a été caractérisé. Les variations de concentration de cytokines sont représentées par rapport à la condition non exposée à LC (n=1).

Cependant ce n'est pas le seul mécanisme impliqué puisqu'en présence de bactéries inactivées, les cellules A2EN sécrètent aussi des cytokines différentes des cellules A2EN seules. Un mécanisme complémentaire permet donc la production de cytokines en présence de LC : le contact avec les antigènes bactériens. Les cytokines retrouvées dans les SN de cellules A2EN mises en présence de CT puis de LC ou GV semblent confirmer que les bactéries du microbiote vaginal sont capables de modifier l'inflammation induite par

l'infection CT : la présence de LC ou de GV exerce un effet distinct mais toujours régulateur de l'inflammation induite par CT.

Dans un second temps, nous avons recherché quel pouvait être l'impact de l'environnement cytokinique créé par les cellules épithéliales, dans les différentes conditions, sur les cellules immunitaires sous-jacentes au niveau de la muqueuse. Les neutrophiles étant les premières cellules immunitaires recrutées à la suite d'une infection CT³³³, nous avons donc testé l'impact des surnageants des cellules A2EN sur leur phénotype et leur survie. Le phénotype et la fonction des neutrophiles au niveau des muqueuses du TRF n'étaient jusqu'à présent pas décrit. Nous avons pu montrer que les SN des cellules A2EN mis en présence des bactéries du microbiote vaginal avaient un impact sur l'expression de marqueurs d'activation des neutrophiles : l'expression de CD11b était augmentée de manière significative avec LC, mais pas avec GV. Ces résultats montrent une augmentation de l'activation des neutrophiles. En revanche, dans ces mêmes conditions, CD62L, une L-sélectine nécessaire lors de la diapédèse des neutrophiles⁴⁷⁶, était moins exprimée que lorsque les neutrophiles étaient traités avec du SN des cellules A2EN sans les bactéries du microbiote vaginal. CD62L est normalement surexprimé dans les neutrophiles sanguins activés. Cependant, une fois dans le tissu, l'expression de CD62L est diminuée. On peut donc faire l'hypothèse que les facteurs solubles (cytokines et métabolites produits par les bactéries) présents dans les SN des cellules A2EN en présence des bactéries du microbiote ont permis la signalisation d'un environnement muqueux conduisant à la diminution de l'expression de CD62L au niveau des neutrophiles, contrairement aux autres SN des cellules A2EN (ne contenant pas de métabolites microbiens). Les SN de cellules A2EN mis en présence de GV ont également eu un impact sur la survie des neutrophiles : après 24h ou 48h de culture, la fréquence de neutrophiles nécrotiques était augmentée par rapport aux autres conditions. La forte inflammation dans ces conditions n'est donc pas associée à une augmentation de la survie des neutrophiles, en présence des SN des cellules A2EN infectées par CT sans bactéries du microbiote vaginal. GV pourrait donc produire des métabolites qui affectent la survie des neutrophiles. Ainsi l'ensemble de ces données renforce l'idée que le microbiote vaginal permet de moduler l'inflammation génitale⁴⁷⁷ et pourrait donc également impacter le risque d'acquisition d'IST.

Nous avons donc testé dans un troisième temps les SN de cellules A2EN sur la susceptibilité à l'infection par le VIH-1. Nous avons pu montrer que seuls les SN de cellules A2EN en présence de GV diminuaient de manière significative l'infection par un virus pseudotypé avec l'enveloppe du VIH-1_{BaL}. Cet effet était aussi visible dans un modèle d'infection avec un virus pseudotypé avec VSV-G, dont l'entrée est indépendante des récepteurs du VIH-1. Le mécanisme d'inhibition de l'infection VIH-1 a donc lieu après l'entrée du virus dans les cellules U87. Cependant *in vivo*, la présence de GV est associée à une augmentation du risque d'acquisition du VIH-1. Dans le modèle expérimental *in vitro*, l'environnement cytokinique et la présence de métabolites microbiens induisent au contraire une diminution du risque d'infection. Nous sommes donc dans un modèle où l'inflammation est protectrice. Contrairement aux données obtenues *in vivo*, dans le modèle *in vitro* GV n'a pas un effet sur l'ensemble de la muqueuse, mais uniquement sur les cellules épithéliales. Dans ce contexte, l'environnement cytokinique induit par GV est protecteur, mais *in vivo*, elles causent également d'autres effets au niveau de la muqueuse, tel que le recrutement de cellules immunitaires, qui ont un effet différent de celui observé dans le modèle *in vitro*. Ce modèle nous a donc permis de caractériser cette inflammation protectrice induite par les cellules épithéliales. La présence de lactobacilles n'a pas permis d'observer de niveaux d'infection diminués tels que cela a été décrit dans la littérature^{448,478}. Nous avons testé différents modèles d'infection pour tester l'effet des SN des cellules A2EN en présence ou non de LC sur la susceptibilité à l'infection VIH-1_{BaL}. Par exemple, des PBMC humains activés ont été mis en présence du VIH-1 et l'infection virale a été suivie en fonction du temps en dosant la quantité de l'antigène p24, soit dans les SN des PBMC, soit par marquage intracellulaire. Nous avons testé différentes MOI d'infection, mais dans les conditions testées, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences entre les conditions expérimentales car la variabilité des résultats était trop importante pour permettre de conclure. Nous avons également étudié l'infection VIH-1 sur des cellules isolées du TRF humain (et en particulier de l'endocol). Cependant nous avons utilisé des cellules décongelées et nous n'avons pas réussi à les infectées, probablement en raison d'une forte mortalité due au processus de congélation. Une perspective de ce travail est donc de tester la susceptibilité de l'infection VIH-1 en présence des SN de cellules A2EN dans les différentes conditions sur des cellules

fraichement isolées du TRF qui sont susceptibles à l'infection VIH-1 comme notre équipe l'a montré (Benjelloun et al., non publié). Dans tous les cas, ce modèle *in vitro* n'a pas permis de mettre en évidence un effet de LC sur l'infection VIH-1. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que la protection induite par les LC contre le VIH-1 intervient à un autre niveau, et pas uniquement au niveau des cellules épithéliales, car *in vivo*, la présence de LC au niveau de la muqueuse est associée à une moindre susceptibilité à l'infection VIH-1.

De manière plus générale, nous avons donc pu montrer que l'environnement du TRF et en particulier le microbiote vaginal, joue un rôle sur l'inflammation et l'établissement des IST. Il pourrait avoir un impact sur le risque de co-infections. L'interaction du microbiote (et donc sa composition) avec les différents facteurs présents au niveau du TRF est donc à prendre en considération pour développer de nouvelles stratégies de prévention innovantes contre les IST.

4.5 Perspectives

Ce modèle *in vitro* simplifié ne rend pas compte de la complexité des muqueuses du TRF, qui contiennent une diversité de cellules (dont des cellules immunitaires résidentes) et une architecture élaborée. Une étude *in vivo* complémentaire a ainsi été réalisée au sein du laboratoire chez le macaque cynomolgus et a permis d'étudier le rôle du microbiote sur les niveaux d'inflammation locale dans un contexte d'infection CT en présence ou non de LC. L'article est présenté en Annexe I. Cette étude a principalement été réalisée par Cindy Adapen, une ancienne doctorante au sein du laboratoire. J'ai notamment participé aux discussions et à la conception de cette étude, aux analyses des populations de neutrophiles et de manière plus générale, à l'analyse critique des différentes données obtenues. Un résumé de cette étude est présenté ci-dessous.

Au cours de cette étude, le microbiote vaginal de femelles macaques cynomolgus a été modifié pour enrichir le microbiote en espèces de lactobacilles. L'impact de la composition du microbiote a été évalué sur l'inflammation au niveau du TRF et sur la susceptibilité à l'infection CT. Douze femelles macaques ont reçu trois traitements antibiotiques (métronidazole) sur une semaine, puis un groupe (n=6) a été traité pendant deux semaines en vaginal avec un gel contenant des *L. crispatus*, et l'autre groupe (n=6) non. Ensuite, les

deux groupes ont été exposés à de faibles doses (6 répétitions) de CT en intravaginal. Deux jours avant chaque inoculation de CT, le groupe traité recevait systématiquement le gel contenant des *L. crispatus*, alors que le groupe non traité recevait uniquement CT.

Le traitement antibiotique a augmenté de façon significative l'abondance des espèces de lactobacilles naturelles. A l'issue des traitements au gel contenant des *L. crispatus*, le groupe traité a présenté un enrichissement en espèces de *L. crispatus* au niveau du microbiote vaginal, tandis que le groupe non traité présentait un enrichissement en autres espèces de lactobacilles (telles que *L. johnsonii*) dû au traitement antibiotique. Le profil de cytokines ou le phénotype des neutrophiles au niveau sanguin n'était pas significativement différent avant et après traitements antibiotique ± gel de *L. crispatus*. Cependant, au niveau vaginal, si aucune différence n'a été mise en évidence au niveau du phénotype des neutrophiles, au niveau du profil cytokinique, le groupe traité au gel de *L. crispatus* présentait un profil moins inflammatoire (diminution de G-CSF, IL-1 β , IL-13, CCL2, TGF α , TNF α et VEGF) par rapport au groupe non traité.

L'exposition des macaques à CT a mené à l'infection de 5 des 6 animaux dans chacun des deux groupes, et aucune différence au niveau de la charge bactérienne n'a pu être mise en évidence entre les groupes. L'infection CT a conduit à des modifications de la composition du microbiote vaginal dans les deux groupes d'animaux. De manière intéressante, l'abondance des *L. johnsonii* était associée à la charge bactérienne dans le groupe non traité. Au niveau inflammatoire, dans les deux groupes, l'infection CT a entraîné l'augmentation de la quantité de neutrophiles matures et activés au niveau sanguin, mais pas au niveau vaginal. La réponse lymphocytaire T spécifique de CT au niveau sanguin était principalement orientée Th1. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes. Le profil cytokinique a également été évalué suite aux expositions CT. Au niveau sanguin, une augmentation de la production de cytokines a été mise en évidence après l'infection CT chez les animaux non traités par rapport aux animaux traités par *L. crispatus*. Dans les fluides cervico-vaginaux, l'infection CT a induit une plus forte production de cytokines dans le groupe traité par rapport au groupe non traité. Les différences en terme de production de cytokines mises en évidence entre les deux groupes suite au traitement antibiotique ± gel de *L. crispatus* persistent au niveau vaginal. Un autre résultat important concernait le

développement d'anticorps spécifiques de CT dans le sang, plus important dans le groupe traité que dans le groupe non traité.

Pour résumer, dans le groupe des femelles macaques cynomolgus dont le microbiote vaginal était enrichi en *L. crispatus*, lors de l'infection CT la production de cytokines pro-inflammatoire au niveau vaginal est plus élevée que dans le groupe non traité au gel de *L. crispatus*. Les femelles traitées présentent également un meilleur contrôle de l'inflammation systémique et produisent plus d'IgG spécifiques de CT suite à l'infection. La composition du microbiote vaginal a donc un impact important sur la réponse immunitaire locale et systémique au cours d'une infection CT. Cette étude confirme donc que la composition du microbiote vaginal est un outil puissant capable de moduler l'inflammation locale, la réponse immunitaire et la susceptibilité aux IST. Cette étude renforce l'idée que certaines souches de LC pourraient être utilisées comme agents probiotiques dans le cadre de stratégie de prévention contre les IST.

DISCUSSION GENERALE

Au cours de cette thèse, différents facteurs de l'environnement du TRF ont été étudiés dans un contexte physiologique ou d'IST. Nous avons analysé leurs interactions avec les muqueuses du TRF. Nous nous sommes intéressés en particulier au LS et au microbiote vaginal, deux paramètres qui influencent la réponse immunitaire au niveau du TRF et la susceptibilité aux IST. Nous avons étudié l'infection par *C. trachomatis*, l'IST bactérienne majoritaire chez les jeunes femmes, qui induit une forte inflammation au niveau génital. L'objectif de ce projet était de déterminer quels facteurs au sein de la muqueuse sont les contributeurs majeurs de l'inflammation au niveau du TRF, en conditions physiologiques ou au cours d'une IST, et ainsi d'explorer les voies qui permettraient de réduire l'inflammation au niveau du TRF. L'inflammation génitale est associée à une augmentation du risque d'IST, et en particulier de l'infection par le VIH-1. Il est donc important d'identifier quels paramètres sont associés à l'augmentation de l'inflammation liée à une susceptibilité plus importante du risque d'IST, notamment lors d'une infection CT, afin de réduire le risque de co-infection subséquente au VIH-1. Les résultats de ce travail devraient donc permettre d'ouvrir des pistes pour le développement de nouvelles stratégies de prévention efficace contre les IST ou d'autres problèmes liés à l'inflammation et qui affectent la santé reproductive. Par exemple, des stratégies d'interventions au niveau du TRF, qui visent à moduler la composition du microbiote vaginal ou la composition du LS, pourraient avoir un impact au niveau du TRF sur l'inflammation génitale et la susceptibilité aux IST. Nous avons pu mettre en place des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, essentiels pour étudier l'impact des facteurs de l'environnement du TRF sur l'inflammation génitale, la susceptibilité aux IST et la réponse immunitaire à ces IST.

Nous avons développé un modèle humain *in vitro* pour mieux caractériser les mécanismes impliquant la modulation de l'inflammation induite au cours d'une infection par CT en présence de différents facteurs de l'environnement, dont le LS. Ensuite, l'effet de cette inflammation a été testé pour évaluer sa capacité à modifier le phénotype et les fonctions des neutrophiles. Cependant, ce modèle ne récapitule pas la complexité de la muqueuse *in vivo*, c'est pourquoi nous avons également développé un modèle préclinique avec le macaque cynomolgus pour étudier *in vivo* l'inflammation au niveau du TRF. Nous avons

tout d'abord caractérisé les variations du microbiote vaginal et de l'inflammation (en termes de production de cytokines et de phénotype des neutrophiles) au niveau du TRF, au cours du cycle menstruel. L'interaction entre les marqueurs inflammatoires et le microbiote vaginal a été analysée et nous avons également comparé les variations observées au niveaux local et systémique. Cette étude nous a permis de montrer les associations entre le microbiote vaginal, les hormones sexuelles et l'inflammation génitale. Cependant, nous n'avons pas pu montrer de corrélation claire entre un facteur spécifique de l'environnement et des marqueurs de l'inflammation locale. Au cours de cette étude *in vivo*, nous n'avons pas pu étudier l'impact de facteurs de l'environnement du TRF sur la susceptibilité aux IST. Nous avons donc réalisé une autre étude *in vivo* pour évaluer l'impact du LS sur l'inflammation locale en contexte physiologique, ou au cours d'une infection CT. Grâce à cette étude, nous avons suivi l'impact 1) d'une simple inoculation de LS sur l'inflammation locale, 2) d'inoculations répétées de LS sur l'inflammation locale et 3) du LS sur la réponse à l'infection par CT. Nous avons pu montrer qu'en présence de LS, la réponse à l'infection CT pourrait avoir des conséquences sur la susceptibilité à d'autres IST, telle que le VIH-1.

Enfin, nous avons utilisé le modèle humain *in vitro* pour mieux caractériser les mécanismes impliquant les bactéries du microbiote et l'inflammation induite par l'infection par CT. Nous avons donc étudié l'effet des bactéries du microbiote vaginal humain sur l'inflammation induite par CT. Ensuite, l'effet de cette inflammation a été testé pour évaluer sa capacité à modifier le phénotype et la survie des neutrophiles, ainsi que la susceptibilité au VIH-1.

1 CARACTERISATION DE L'INFLAMMATION AU NIVEAU DU TRF

L'environnement du TRF, et plus particulièrement l'inflammation, est important pour le maintien d'une santé sexuelle optimale chez la femme⁴⁷⁹. L'inflammation a un impact en condition physiologique, puisqu'elle détermine le succès de nombreuses étapes intervenant au cours de la grossesse, ou encore lors d'une infection, puisqu'elle peut influencer la susceptibilité à des IST. Le rôle des différents acteurs de l'inflammation est partiellement décrit au niveau du TRF : en particulier, le phénotype et les fonctions des neutrophiles n'étaient pas décrits jusqu'à présent au niveau des muqueuses du TRF. Or les neutrophiles sont les premières cellules recrutées au niveau des muqueuses en cas d'inflammation, et elles jouent un rôle clé dans de nombreux processus biologiques, il était donc important de

les identifier et de les caractériser⁴⁸⁰.

1.1 En condition physiologique

Au cours de cette thèse, nous avons étudié le phénotype et les fonctions des neutrophiles au niveau du TRF. Nous avons développé un modèle *in vitro* visant à mieux comprendre le rôle de l'environnement muqueux (en termes d'inflammation) sur le phénotype et les fonctions de neutrophiles (Figure 27). Ce modèle a permis d'étudier de manière séquentielle les différentes étapes se produisant au niveau de la muqueuse du TRF : les cellules épithéliales sont en contact avec différents facteurs de l'environnement, puis elles sécrètent des médiateurs inflammatoires qui agissent sur les cellules de la *lamina propria*. Après 24h de culture sans aucun stimulus, les cellules A2EN sécrètent différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6, GM-CSF, IL-1RA, CXCL10), qui sont également retrouvées *in vivo* chez la femme⁴⁸¹ ou pour des cellules épithéliales primaires isolées des muqueuses du TRF⁴⁷⁴. Ce profil d'expression des différentes cytokines diffère de celui décrit par Buckner et al.⁴³⁹. Nous avons pu vérifier en utilisant des agonistes de TLR que la production par les cellules A2EN de diverses cytokines pouvait être stimulée, comme déjà décrit, en revanche, la concentration d'IL-8 n'était pas augmentée par le poly(I:C), ni dans aucune autre des conditions expérimentales. Pourtant, Buckner et al., ont montré qu'il était possible de stimuler par le poly(I:C) la production d'IL-8 par les cellules A2EN⁴³⁹, mais ces résultats ont été obtenus sur cellules polarisées, et avec une méthode de quantification différente. Par ailleurs, le niveau basal d'IL-8 était déjà très élevé dans nos expériences. La polarisation des cellules joue probablement un effet sur leur réponse face aux stimulations représentant les facteurs de l'environnement, puisque *in vivo*, ceux-ci n'agissent qu'au niveau de la membrane apicale, et les cellules peuvent y répondre en sécrétant des facteurs dans la lamina propria, au niveau de la membrane basolatérale. Dans notre modèle, il n'est pas possible d'étudier cette compartimentalisation car les cellules ne sont pas polarisées. Néanmoins, nous avons montré que, par rapport à du milieu de culture seul, les surnageants des cellules endocervicales humaines A2EN affectent le phénotype des neutrophiles issus du sang périphérique (Tableau 6), en augmentant d'une part le niveau de CD11b, CD32a et CD62L, suggérant une activation des neutrophiles et d'autre part augmentant les niveaux de CD10 et CD101, suggérant une maturation des neutrophiles.

Tableau 6 : Impact des différentes conditions expérimentales sur le phénotype des neutrophiles *in vitro*. Les surnageants des cellules A2EN dans les différentes conditions expérimentales ont été mis en présence de neutrophiles issus du sang périphérique. Leur phénotype a été caractérisé et est résumé dans le tableau ci-dessous.

Condition expérimentale	CD11b	CD62L	CD10/CD101 /CD32	PD-L1
milieu de culture (DMEM)	-	+	+	+
NI	+	++	++	+
CT	++	++	++	+
LS	++	++	++	+
CT+LS	++	++	++	+
LC	+++	+/-	++	+
CT+LC	+++	+/-	++	+
GV	+++	+/-	++	+
CT+GV	+++	+/-	++	+
poly(I:C)	++	++	++	+

Cependant, ce modèle *in vitro* ne récapitule pas la complexité des muqueuses du TRF, et un modèle complémentaire a été développé *in vivo*. Nous avons donc étudié les variations de médiateurs de l'inflammation (en suivant la production de cytokines et les neutrophiles) au cours du cycle menstruel chez 9 femelles macaque cynomolgus. Nous avons montré que la production de cytokines était augmentée pendant les menstruations. Chez la femme, le cycle menstruel régule également la production de cytokines au niveau du TRF^{45,142}. Les proportions de cellules NK et des macrophages sont également impactées par le cycle menstruel au niveau du TRF^{63,482}. Cependant, les phénotypes des neutrophiles présents localement n'ont jamais été étudiés jusqu'à présent chez les femmes. Nous avons caractérisé ici pour la première fois le phénotype des neutrophiles au niveau cervicovaginal dans un modèle macaque (Figure 34A). Nous avons démontré que le phénotype des neutrophiles au niveau cervicovaginal était différent de celui du sang, et variait au cours du cycle menstruel : lors des menstruations, la fréquence d'une population faiblement activée et exprimant CD62L augmentait. Nous suggérons que cette population de neutrophiles est spécifique du sang menstruel. Cette étude souligne l'importance de prendre en compte le cycle menstruel dans les études portant sur l'immunité au niveau du TRF et la susceptibilité aux IST. Wira et al. ont décrit une "fenêtre de vulnérabilité", à la fin de la phase lutéale au

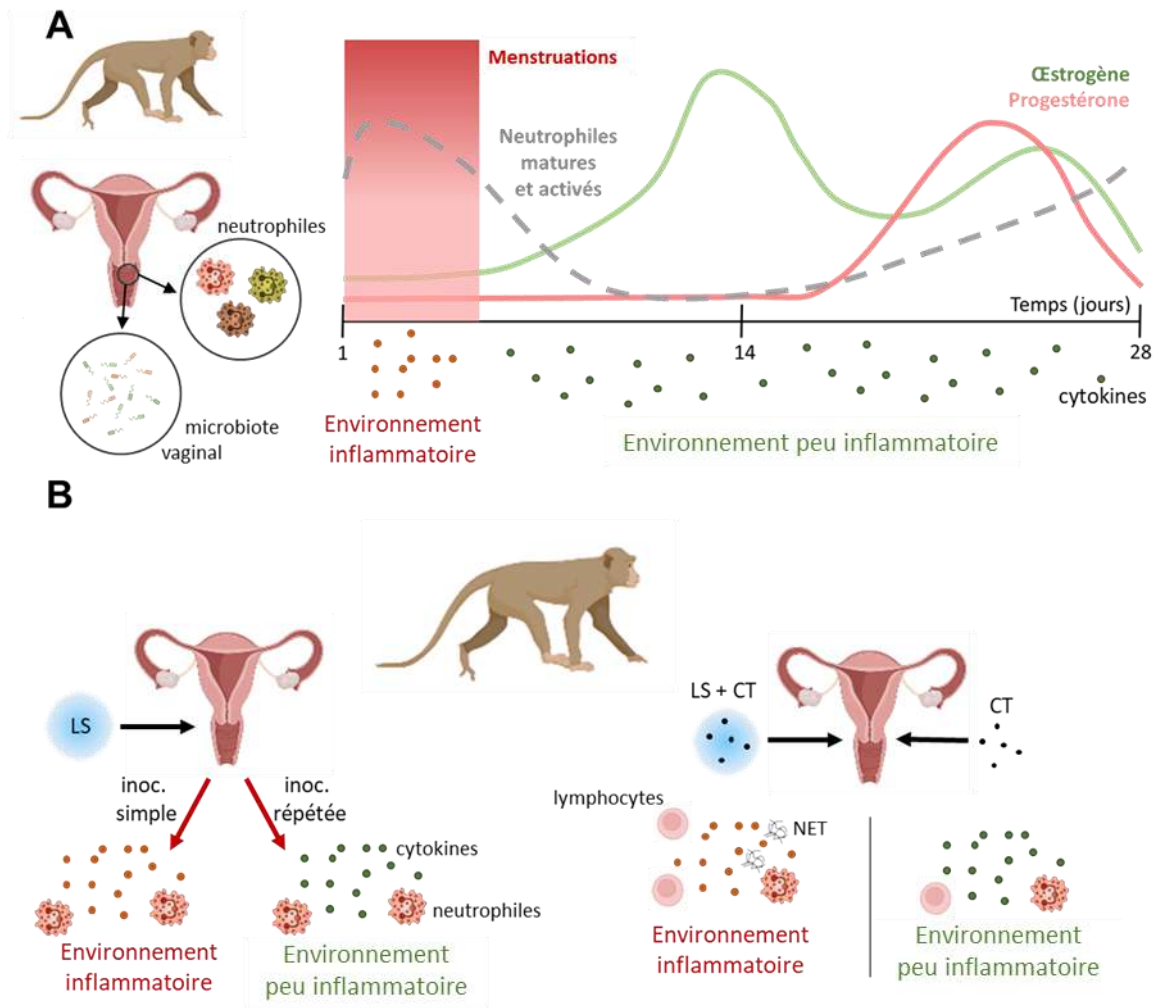


Figure 34 : Résumé des principaux résultats obtenus *in vivo* au cours de la thèse. (A) Caractérisation de l'inflammation génitale au cours du cycle menstruel. (B) Effet du LS sur l'inflammation génitale en condition physiologique, ou pendant une infection CT.

cours de laquelle l'immunité est modifiée afin d'éviter le rejet d'un éventuel fœtus⁹. Pendant cette période, le TRF est plus susceptible aux IST. Le moment du recrutement de cette population de neutrophiles pourrait correspondre à cette fenêtre de vulnérabilité. Cette population de neutrophiles, matures et activés, pourrait alors favoriser des brèches de l'épithélium, des modifications de la composition du microbiote vaginal et/ou une inflammation élevée au niveau du TRF. Ces modifications ont toutes été associées à une susceptibilité accrue à des IST. En conclusion, la présence de cette population de neutrophiles matures et activés pourrait favoriser l'acquisition d'IST. Par ailleurs, nous avons également étudié l'impact de l'environnement muqueux sur les fonctions des neutrophiles (Tableau 7) ; *in vitro*, les surnageants des cellules A2EN avaient un effet sur les

Tableau 7 : Impact des différentes conditions expérimentales sur les fonctions des neutrophiles *in vitro*. Les surnageants des cellules A2EN dans les différentes conditions expérimentales ont été mis en présence de neutrophiles issus du sang périphérique. Leur viabilité, leur capacité de phagocytose et de production de ROS ont été caractérisées et sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Condition expérimentale	Viabilité	Phagocytose	ROS
milieu de culture (DMEM)	+	+	+
NI	++	++	++
CT	+++	+++	++
LS	++	+++	+++
CT+LS	++	+++	+++
LC	++	ND	ND
CT+LC	++	ND	ND
GV	+	ND	ND
CT+GV	+	ND	ND
poly(I:C)	++	+++	+++

fonctions des neutrophiles. Par rapport au milieu de culture seul, les surnageants des cellules A2EN entraînaient une augmentation de la survie, de la capacité de phagocytose et de la production de ROS. Ceci suggère que les cellules épithéliales créent un environnement au niveau du TRF qui favorise l'activation des neutrophiles. Ceci est cohérent avec les données de la littérature, qui montrent que les cellules immunitaires présentes au niveau du TRF humain ou macaque sont globalement activées^{25,462}.

Le TRF est une des portes d'entrée principales pour de nombreuses IST. Dans les différents modèles utilisés, nous avons cherché à caractériser la réponse du TRF à l'infection CT, l'IST bactérienne majoritaire chez les jeunes femmes.

1.2 Au cours de l'infection CT

Dans le TRF, CT infecte principalement les cellules épithéliales au niveau du col de l'utérus dans un premier temps³³³. Lorsque l'infection n'est pas traitée, CT peut persister au niveau du TRF sous une forme « aberrante », non répliquative.

La persistance de CT au sein des cellules épithéliales ou plus fréquemment d'autres cellules infectées telles que les macrophages, est un problème pour l'élimination de la bactérie³⁵⁵. Au niveau des macrophages infectés, la croissance de *Chlamydia* est limitée grâce au trafic des lysosomes, la production de ROS ou encore la faible quantité de nutriments nécessaires à la réplication de *Chlamydia*³⁷⁷. Il pourrait donc être important de comprendre les premières étapes favorisant la formation de ces potentiels réservoirs de persistance de *Chlamydia* (pour revue, voir Lausen et al, 2018)³⁷⁷.

En effet, dans ce cas, les antigènes bactériens sont moins exposés, et la bactérie est plus difficilement détectée par le système immunitaire. Il a été démontré que l'azithromycine n'est pas suffisante pour éliminer l'infection par CT dans les macrophages. Dans un modèle souris, les auteurs ont montré que l'action des neutrophiles, induite par une protéine bactérienne (CT135) déclenche l'activation de l'inflammasome NLRP3 via la signalisation TLR2/MyD88 au niveau de macrophages, à l'origine d'une endométrite causant l'infertilité de souris⁴⁸³. Dans notre étude *in vivo*, nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de recrutement différentiel ou des différences phénotypiques au niveau des macrophages présents dans les différents compartiments du TRF suite à l'infection CT. L'étude citée précédemment montrent cependant également le rôle des neutrophiles dans l'infection *Chlamydia*. Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires recrutées sur le site de l'infection CT³³³. Ils permettent la clairance des agents pathogènes via diverses activités antimicrobiennes (dégranulation, phagocytose, production de ROS et de NET...) ^{92,116}. Cependant, leur rôle au cours de l'infection CT n'est pas entièrement compris. Ils pourraient être à l'origine de la pathologie immunitaire induite lors de l'infection CT³⁶⁷ : dans une étude *in vitro*, CT augmente le recrutement et les réponses antimicrobiennes des neutrophiles³⁶⁶. Cependant, dans d'autres contextes expérimentaux, les neutrophiles sont paralysés par CT et leurs réponses sont contrecarrées³⁷². De plus, dans des modèles de souris *in vivo*, les neutrophiles peuvent contribuer à la protection médiée par les anticorps contre l'infection à CT³⁷⁴, ou au contraire, conduire à une pathologie associée à CT, sans réduire la charge bactérienne³⁶⁷. Ces études mettent en évidence la nécessité de mieux caractériser le rôle de ces cellules lors de l'infection CT.

In vitro, nous avons montré que l'infection par CT des cellules A2EN entraîne la production

de cytokines pro-inflammatoires, mais de manière relativement modeste, comme déjà rapporté dans la littérature³⁴⁹.

Nous avons ensuite testé l'impact des surnageants des cellules A2EN infectées par CT sur des neutrophiles isolés du sang. *In vitro* et *in vivo*, l'infection CT ne semble pas affecter le phénotype des neutrophiles. En revanche, CT a un impact sur les fonctions des neutrophiles *in vitro*. Les surnageants des cellules A2EN infectées par CT augmentent la survie des neutrophiles issus du sang périphérique. Par ailleurs, les surnageants de cellules A2EN infectées par CT favorisent la phagocytose des neutrophiles par rapport aux surnageants de cellules non infectées. *In vivo*, nous avons pu tester la NETose, et n'avons pas observé de modification de cette fonction au niveau des fluides cervicovaginaux suite à l'infection CT. De nombreux autres facteurs sont présents au niveau du TRF en conditions physiologique, ou lors de l'acquisition d'IST : c'est par exemple le cas du LS ou du microbiote vaginal. Le rôle de ces facteurs au niveau du TRF est complexe, ils déterminent par exemple la susceptibilité aux IST de manière directe ou indirecte, par exemple en modulant l'inflammation⁴⁸⁴. Cependant, les mécanismes sous-jacents sont souvent peu documentés, notamment dans le cadre de co-infections.

2 RÔLE DES FACTEURS DE L'ENVIRONNEMENT AU NIVEAU DU TRF

2.1 Le liquide séminal

2.1.1 En condition physiologique

Le LS est un fluide complexe qui possède des propriétés immunitaires antagonistes en fonction des conditions expérimentales^{485,486}. Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence ses propriétés pro- et anti-inflammatoires dans les différents modèles expérimentaux, à partir d'un même pool de LS humain. *In vivo*, nous avons montré qu'une seule inoculation intravaginale de LS chez des femelles macaques était associée à une réaction pro-inflammatoire, alors que des inoculations répétées pouvaient avoir un effet tolérogène avec une inflammation réduite (Figure 34B). *In vitro*, le pool de LS a également un effet anti-inflammatoire sur les cellules épithéliales (Figure 35A). Le TGB- β était la cytokine la plus concentrée dans le pool de LS, comme décrit dans la littérature⁴⁸⁷. Cette cytokine pourrait être le principal modulateur de la production de cytokines par les cellules

A2EN, car elle est impliquée dans de nombreux processus immunomodulateurs au niveau du TRF^{255,487}. *In vitro* et *in vivo*, l'effet du LS observé sur la production de cytokines ne semble pas provenir de cytokines résiduelles du LS, car les cytokines différentiellement exprimées après exposition au LS sont différentes de celles présentes dans le LS.

La réponse au LS est donc médiée par une régulation de la production de cytokines mais pas uniquement. Au cours de cette thèse, nous avons trouvé des changements dans la fonction des neutrophiles, et moins au niveau de leur phénotype (Tableaux 5 et 6). *In vitro*, les surnageants des cellules A2EN exposées au pool de LS entraînent une augmentation de CD62L au niveau des neutrophiles issus du sang périphérique, ce qui suggère une augmentation de leur capacité à migrer dans les tissus. *In vivo*, le phénotype des neutrophiles au niveau muqueux ne semble pas affecté par le LS. Au niveau fonctionnel, nous avons montré que *in vitro* le pool de LS augmentait la capacité de phagocytose des neutrophiles par rapport à la condition non stimulée. *In vivo*, une augmentation de la NETose est observée après chaque inoculation de LS. L'augmentation de la NETose lors d'une exposition au sperme a déjà été mise en évidence dans de nombreuses études^{286,488,489}. Cependant à ce jour, les mécanismes impliqués dans l'induction de cette NETose sont inconnus. Les composants du LS jouent un rôle important dans la régulation de la fonction des neutrophiles^{287,288} et la NETose est associée à différentes conditions pathologiques au niveau du TRF telle que l'infertilité⁴⁹⁰. Comprendre les mécanismes impliqués dans ces régulations sera donc essentiel pour développer des stratégies thérapeutiques visant les neutrophiles dans le cadre du traitement de différentes pathologies de la reproduction. Par exemple, dans les cas d'infertilité où le LS induit un excès de NETose au niveau du TRF, conduisant au piégeage des spermatozoïdes et donc à des problèmes de fertilité, il sera utile de comprendre quels facteurs du LS sont impliqués dans l'induction de cette NETose afin de trouver des stratégies visant à réduire l'inflammation au niveau du TRF et l'induction de ces NETs. Par ailleurs, *in vivo*, nous avons pu analyser les populations de cellules isolées des tissus du TRF afin de comprendre la réponse immunitaire à l'exposition au LS. Nous avons montré que l'exposition au LS induisait des modifications de la fréquence des cellules immunitaires, avec un ratio CD4+/CD8+ élevé dans le vagin par rapport aux autres compartiments TRF et à ce qui est classiquement décrit en conditions physiologiques dans

la littérature^{25,63}. Les inoculations intravaginales de LS induiraient donc un recrutement de lymphocytes T CD4+ dans le vagin.

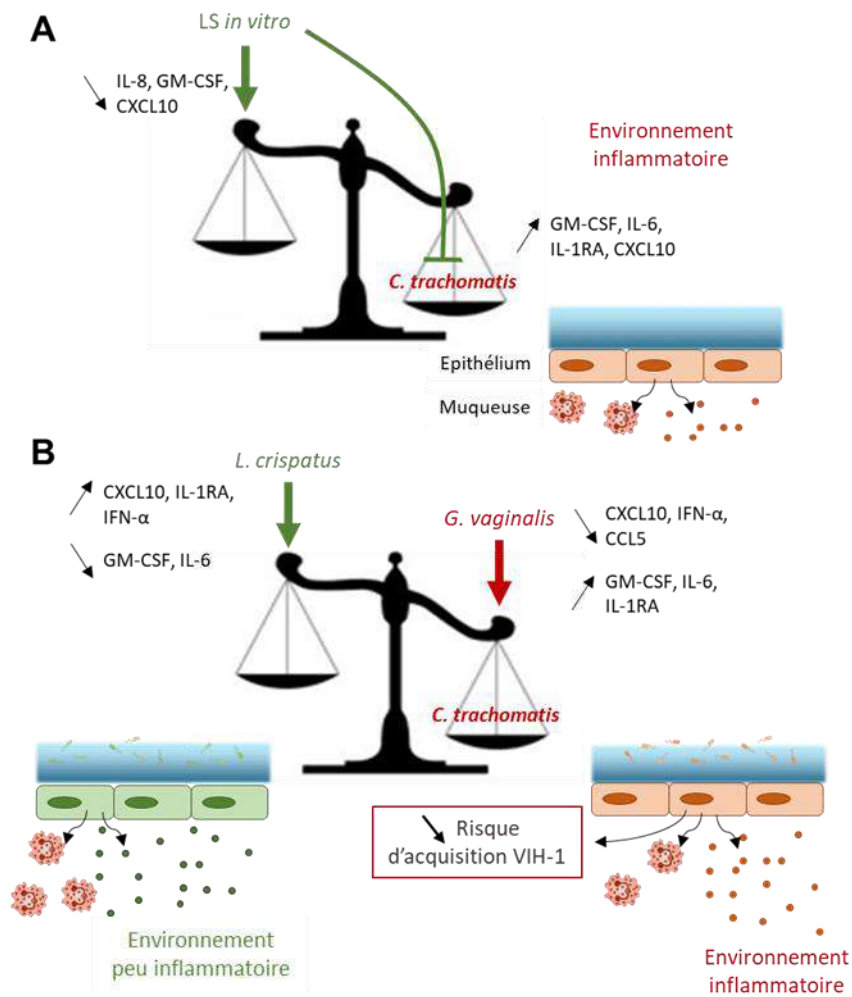


Figure 35 : Résumé des principaux résultats obtenus *in vitro* au cours de la thèse. (A) Effet du LS sur l'inflammation induite par l'infection CT. (B) Effet des bactéries du microbiote vaginal sur l'inflammation induite par l'infection CT.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le LS est un puissant immunomodulateur et pouvait affecter l'acquisition des IST, positivement ou négativement²⁵⁵. Au cours de cette thèse, nous avons utilisé un pool de LS, possédant un profil cytokinique modérément inflammatoire. Or chez l'Homme, la composition LS peut présenter une forte variabilité inter-individuelle, notamment au niveau de sa composante inflammatoire (cytokines, présence de leucocytes ou non, ...). L'étude de LS isolés à partir de différents donneurs permettra donc de comprendre quels facteurs du LS sont déterminants dans la modulation de l'inflammation au niveau du TRF, et lors de la transmission d'IST. En effet, lors de la

transmission de CT de l'homme vers la femme, le LS agit comme un vecteur pour la bactérie. Nous avons donc cherché à comprendre son rôle au cours de l'infection CT.

2.1.2 Au cours de l'infection CT

Le LS est un puissant modulateur de la susceptibilité aux IST, et notamment lors de l'infection par le VIH-1. Le rôle des différents composants du LS sont particulièrement bien décrit dans l'infection VIH-1. Différentes études ont montré que le LS diminue la susceptibilité au VIH-1 en inhibant l'interaction du virus avec les cellules cibles^{308,309}, ou via la présence de différents facteurs aux propriétés antimicrobiennes présents dans le LS^{255,310}. A l'inverse, d'autres facteurs présents dans le LS facilitent l'infection par le VIH-1. Le facteur activateur de l'infection virale (SEVI) présent dans le LS a notamment été impliqué dans la facilitation de l'infection par le VIH-1⁴⁹¹. En revanche, le LS est peu étudié dans le contexte d'autres IST. Les agents causant les IST, bactéries ou virus, présentent des caractéristiques différentes en termes de mécanismes d'infections, de cellules cibles ou encore au niveau de la réponse immunitaire à l'infection. Le rôle des différents facteurs du LS dans la modulation de la susceptibilité au VIH-1 ne sont donc pas tous transposables aux IST bactériennes. Seules quelques études récentes ont étudié les relations entre les paramètres séminaux et l'acquisition d'IST bactériennes⁴⁹²⁻⁴⁹⁴. Il est donc important de mieux caractériser l'impact du LS sur l'acquisition d'IST au niveau du TRF, notamment pour les IST bactériennes. Nous avons rapporté pour la première fois qu'un pool de LS inhibe *in vitro* l'infection CT de cellules épithéliales endocervicales humaines (Figure 35A). L'analyse du profil transcriptionnel des cellules A2EN infectées par CT suggère un retard de croissance de CT en présence de LS. Par ailleurs, plusieurs gènes de l'hôte étaient également régulés de manière différentielle par le LS et/ou CT. Les cytokines retrouvées dans les surnageants de cellules A2EN infectées par CT en présence de LS semblent confirmer l'effet du LS sur l'infection CT : la présence du LS entraîne une diminution de l'expression de cytokines induites par CT. Tous ces effets du LS sont dose dépendant.

L'effet du LS sur l'infection CT a également été testé *in vivo*. Il s'agit de la première étude *in vivo* évaluant l'impact du LS sur la susceptibilité à CT. Nous avons montré qu'en présence de LS, l'exposition à CT entraînait l'infection de tous les animaux, mais seulement 2/3 étaient infectés dans le groupe exposé sans LS. De plus, l'ordre de grandeur de la charge

bactérienne étaient plus élevées dans le groupe CT+LS par rapport au groupe CT. L'effet inhibiteur du LS sur l'infection CT observé *in vitro* n'est donc pas retrouvé dans cette étude *in vivo*. Nous pouvons faire l'hypothèse que l'environnement vaginal neutralise le(s) facteur(s) impliqué(s) dans l'inhibition de l'infection CT observée *in vitro*, peut-être par un effet de dilution puisque nous avons montré que l'inhibition *in vitro* était dose dépendante. Une autre hypothèse pourrait être que le(s) facteur(s) inhibiteur(s) est/ont neutralisé(s) par des facteurs de l'environnement présent au niveau TRF de macaques. En effet, les femelles macaques cynomolgus possèdent un microbiote vaginal composé de différentes espèces de bactéries anaérobies, qui peuvent sécréter des protéases ou sialidase⁹, peut-être responsables de la dégradation du/des facteur(s) inhibiteur(s). Cela montre l'importance de ces approches complémentaires : l'effet que nous pouvons observer au niveau des cellules épithéliales ne récapitule pas toute la complexité de la muqueuse *in vivo*, avec la *lamina propria* sous-jacente et ses cellules immunitaires. Mais un modèle *in vitro* simplifié permet de disséquer le rôle des différents facteurs et les événements séquentiels survenant dans la muqueuse.

Nous avons ensuite testé l'impact du pool de LS sur les neutrophiles. *In vitro* et *in vivo*, la présence de LS lors d'une infection CT semble peu affecter le phénotype des neutrophiles. Le seul impact a été observé *in vitro* : de fortes concentrations de LS entraînent une augmentation de CD62L au niveau des neutrophiles issus du sang périphérique, suggérant une augmentation de leur capacité à migrer dans les tissus. Le LS pourrait donc impacter le recrutement de neutrophiles au niveau du tissu infecté, mais n'aurait pas d'impact sur la maturation ou l'activation des neutrophiles. Le LS semble surtout avoir un impact sur les fonctions des neutrophiles lors de l'infection CT. *In vitro*, nous avons montré que le LS a un impact sur la survie des neutrophiles. En revanche, il n'avait pas d'impact sur la phagocytose et la production de ROS. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que les cytokines impliquées dans la modulation des fonctions des neutrophiles proviennent d'une production par les cellules épithéliales qui n'est pas influencée par la présence de LS (exemple : IL-8).

In vivo, nous avons également pu disséquer la réponse immunitaire à l'infection CT en présence de LS (Figure 34B). L'analyse des cellules isolées des tissus du TRF a révélé que l'exposition à CT induisait une augmentation de la fréquence des lymphocytes T,

notamment CD4⁺ CCR5⁺ au niveau vaginal. Ces cellules sont la cible du VIH-1. Nous avons testé *in vitro* l'impact des surnageants A2EN infectées ou non par CT en présence ou non de LS, sur la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 de cellules cibles. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives de susceptibilité au VIH-1. De nombreuses études épidémiologiques ont montré une plus grande susceptibilité aux VIH-1 lorsqu'une première IST, notamment CT, a été diagnostiquée^{418,495,496}. L'un des mécanismes en cause pourrait ainsi être une augmentation de l'inflammation due à la première IST, conduisant à une susceptibilité accrue aux autres IST^{412,436}. Les résultats obtenus dans cette étude *in vivo* (Article 3) sur le rôle du LS lors de l'infection CT, semblent donc confirmer les résultats obtenus par Schust et al., 2012 : l'augmentation des cellules cibles du VIH-1 après l'infection CT pourrait être un mécanisme impliqué dans l'acquisition de la co-infection CT/VIH-1⁴³⁸. Cependant, d'autres mécanismes pourraient être impliqués tels que des altérations de l'intégrité de la barrière épithéliale, des modifications de la composition du microbiote associées à des modifications de l'inflammation génitale (en termes de production de cytokine, d'activation de cellules immunitaires, ...) ⁴³⁰, etc... Des données complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les rôles des différents paramètres présents localement dans le TRF, et pour déterminer quels sont les médiateurs inflammatoires les plus significatifs pour l'augmentation de la susceptibilité aux IST dans un contexte d'inflammation génitale.

Dans l'ensemble, nos résultats mettent en évidence la nécessité de prendre en compte le LS lors d'études au niveau du TRF sur l'acquisition d'IST. Le LS a un impact significatif sur la susceptibilité à l'infection CT et sur les réponses immunitaires innées à l'infection. Cependant d'autres facteurs de l'environnement interviennent au niveau du TRF. C'est par exemple le cas du microbiote vaginal.

2.2 Le microbiote vaginal

2.2.1 En condition physiologique

L'inflammation cervicovaginale est également fortement associée à la composition du microbiote vaginal. Chez la femme, le genre *Lactobacillus*, et plus particulièrement *L. crispatus*, est associé à une faible inflammation génitale, contrairement aux microbiotes de type IV, plus diversifiés²⁰⁶. Les variations de production des cytokines dues aux bactéries

du microbiote vaginal pourraient être induites via des antigènes microbiens, ou bien via des métabolites produits par ces bactéries (acide lactique, H₂O₂, acides gras à chaîne courte, bactériocines, ...) ^{61,475}. Au cours de la thèse, nous avons caractérisé dans le modèle macaque l'évolution du microbiote vaginal et de l'inflammation (en particulier la production de cytokines et le phénotype des neutrophiles) en parallèle au cours du cycle menstruel (Figure 34A). Nous avons observé des variations de la composition du microbiote vaginal au cours du cycle, et plus particulièrement au moment des menstruations. Ces variations au cours des menstruations étaient associées à une plus forte inflammation génitale. Cependant, nous n'avons pas pu établir de corrélation directe entre la composition du microbiote vaginal et la variation des concentrations de cytokines.

Le modèle *in vitro* a également été utilisé pour étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de l'inflammation par le microbiote vaginal au niveau du TRF (Figure 35B). L'effet de deux bactéries du microbiote vaginal a été étudié : *L. crispatus*, mimant un microbiote vaginal optimal et *G. vaginalis*, bactérie associée à la dysbiose et à la BV ¹⁹⁸. Dans nos expériences, la présence de *G. vaginalis* et de *L. crispatus* est associée à une régulation de l'inflammation en termes de cytokines, comme retrouvé dans la littérature ²⁰⁴. Les surnageants des cellules A2EN en présence de bactéries du microbiote vaginal affectent le phénotype et la survie des neutrophiles issus du sang périphérique (Tableaux 5 et 6). L'effet de *L. crispatus* est différent de celui de *G. vaginalis* : *L. crispatus* entraîne une augmentation du marqueur d'activation CD11b et une diminution de CD62L, ce qui montre une moindre capacité d'adhésion des neutrophiles ; *G. vaginalis* entraîne une diminution de CD62L, et favorise la nécrose des neutrophiles. Les neutrophiles issus du sang périphérique semblent donc être enclins à être activés par le microbiote, et de manière différentielle en fonction des bactéries. Par ailleurs, les facteurs solubles présents dans les surnageants des cellules A2EN en présence des bactéries du microbiote semblent signaler un environnement muqueux conduisant à la diminution de l'expression de CD62L au niveau des neutrophiles, qui est normalement diminuée après la diapédèse des neutrophiles. L'ensemble de ces données semble confirmer que la composition du microbiote vaginal a un impact sur les neutrophiles, tel que l'a présenté Cheu et al., (conférence Keystone, Dec 2018) ⁴⁴⁹. Les auteurs ont mis en évidence, dans un modèle *in vitro*, une activation des neutrophiles par les

bactéries présentes dans les microbiotes vaginaux en dysbiose, mais pas par des lactobacilles. Cette activation des neutrophiles était associée à une forte inflammation et à des dommages de la barrière épithéliale. Les bactéries du microbiote vaginal ont donc un impact sur l'inflammation génitale, et notamment sur les neutrophiles. Au niveau de la muqueuse, ces modifications pourraient être à l'origine d'une susceptibilité accrue au VIH-1, ou à d'autres IST. La composition du microbiote vaginal module donc l'inflammation génitale, et influence la susceptibilité aux IST.

2.2.2 Au cours de l'infection CT

De nombreuses données, épidémiologiques ou mécanistiques, existent concernant le rôle du microbiote dans l'établissement des IST^{419,497}. Les études associent la présence d'agents causant des IST ou des états de dysbioses tels que la vaginose bactérienne à une augmentation du risque d'acquisition d'IST, médiée notamment par une augmentation de l'inflammation génitale. Les lactobacilles sont à l'inverse capables d'interférer avec les IST au niveau du TRF (compétition avec les pathogènes, production de métabolites antimicrobiens, stimulation du système immunitaire...)^{157,473}. Les mécanismes impliqués dans la modulation de l'inflammation génitale sont en revanche souvent peu ou pas documentés, particulièrement dans le cadre des co-infections. Par ailleurs, lorsque les IST sont établies, l'inflammation génitale augmente et le microbiote vaginal évolue souvent vers un état de dysbiose (caractérisé par exemple par une forte abondance de *G. vaginalis*), qui entretient l'inflammation. Un modèle de femelles macaques cynomolgus possédant un microbiote vaginal enrichi ou non en *L. crispatus* a donc été mis en place (Annexe 2), afin d'étudier l'impact du microbiote vaginal sur l'infection CT. Deux groupes d'animaux ayant été traités en vaginal au métronidazole (antibiotique agissant sur les bactéries anaérobies) et ayant reçu ou non plusieurs capsules de *L. crispatus*, ont été exposés à CT (faibles doses répétées). Après l'exposition CT, aucune infection persistante n'a été observée et la charge bactérienne n'était pas différente entre les deux groupes expérimentaux mais des différences au niveau de la réponse immunitaire ont été observées. La concentration d'anticorps anti-CT était plus élevée dans le groupe traité avec les capsules de *L. crispatus* comparé au groupe non traité. Le phénotype des neutrophiles au niveau cervicovaginal variait peu suite à l'infection CT, seule l'expression de CD11b, un marqueur d'activation, diminuait dans les deux groupes

après l'infection CT. Par ailleurs, la présence de *L. johnsonii* a été associée à l'infection par CT dans ce modèle. Les études épidémiologiques montrent que les espèces de lactobacilles, à l'exception de *L. iners*, sont plutôt associées à une faible susceptibilité à la CT^{403,406,407}. Cette différence pourrait s'expliquer par des propriétés différentes entre les lactobacilles retrouvés dans l'espèce humaine et ceux isolés chez les macaques. En effet, il a été montré que les souches de lactobacilles isolés chez des femmes avec un microbiote optimal ou lors d'une BV peuvent avoir des propriétés inflammatoires différentes¹⁷⁰.

L'impact du microbiote vaginal sur l'infection CT et l'inflammation induite par l'infection ont également été étudiés dans le modèle *in vitro* (Figure 35B). Nous avons montré que l'inflammation induite pendant l'infection par CT en présence de *G. vaginalis* ou *L. crispatus* sont similaires à une simple interaction entre *G. vaginalis* ou *L. crispatus* avec les cellules épithéliales. L'effet des surnageants des cellules A2EN sur le phénotype et la survie des neutrophiles sont également similaires. Ce résultat a été obtenu en utilisant une MOI supérieure pour les bactéries du microbiote vaginal comparé à celle utilisée pour CT, pour mimer la situation *in vivo*. Cette différence de MOI pourrait influencer la réponse des cellules épithéliales, mais l'effet du microbiote vaginal semble tout de même plus important que l'infection CT dans la modulation de l'inflammation induite par les cellules épithéliales.

Nous avons montré que les surnageants des cellules A2EN infectées par CT et exposées à *G. vaginalis* entraînent une inhibition de l'infection par le VIH-1. En revanche nous n'avons pas mis en évidence un effet protecteur de *L. crispatus* sur l'infection VIH-1. Dans le contexte du modèle *in vitro*, l'inflammation induite par l'infection est protectrice. Or *in vivo*, les données de la littérature montrent au contraire une susceptibilité accrue à l'infection par le VIH-1 en cas de présence de *G. vaginalis*⁴⁷⁸. Une explication à ces différences pourrait venir du modèle *in vitro*, qui n'est pas totalement représentatif de la structure des muqueuses du TRF *in vivo* (cf partie 3 ci-dessous).

L'ensemble de ces données renforce l'idée que le microbiote vaginal permet de moduler l'inflammation génitale et pourrait donc également impacter le risque d'acquisition d'IST⁴⁷⁷. Les interactions entre les différents facteurs de l'environnement au niveau du TRF doivent être prises en considération afin de développer de nouvelles stratégies de prévention contre les IST telles que CT³⁷⁹. Le modèle expérimental utilisé est aussi à prendre en compte pour

évaluer le potentiel thérapeutique d'un composé, puisque nous avons pu mettre en évidence des différences importantes entre les différents modèles utilisés au cours de cette thèse.

3 COMPARAISON DES MODELES UTILISES

3.1 Modèle *in vitro* vs *in vivo*

Les modèles *in vitro* sont très utiles pour disséquer un environnement complexe tel que les muqueuses du TRF. Ils permettent des études mécanistiques dans des systèmes simplifiés qui évitent un certain nombre de biais d'interprétation. Cependant, ces modèles ne sont pas forcément représentatifs de l'ensemble du TRF et l'interprétation d'un résultat doit prendre en compte le système dans lequel il a été obtenu pour analyser l'effet d'un facteur de l'environnement du TRF par exemple⁴⁴⁰.

Dans nos études, l'analyse de la production de cytokines par des cellules épithéliales endocervicales humaines est pertinente, car c'est la cellule qui est préférentiellement infectée par CT et qui est en contact avec les facteurs de l'environnement du TRF (le LS ou le microbiote vaginal)^{137,333}. Elles sont les premières à répondre à l'infection ou à une exposition dans la lumière du TRF⁹. Dans un second temps, nous avons cherché quel pouvait être l'impact de l'environnement cytokinique créé par les cellules épithéliales, sur les cellules immunitaires sous-jacentes au niveau de la muqueuse. Cependant, le modèle *in vitro* ne rend donc pas compte des interactions complexes qui ont lieu au niveau des cellules immunitaires de la *lamina propria*. Ainsi, contrairement aux données retrouvées dans la littérature, dans le modèle *in vitro* les différents facteurs de l'environnement testés (bactérie du microbiote vaginal ou LS) n'ont pas un effet sur l'ensemble de la muqueuse, mais uniquement sur les cellules épithéliales. De même, dans le modèle *in vitro*, l'infection CT est favorisée car la bactérie est directement et uniquement en contact avec les cellules épithéliales, et les cellules immunitaires de la *lamina propria* capables potentiellement de contrôler l'infection *in vivo* sont absentes dans ce modèle. Dans ce contexte *in vitro*, les cytokines induites par les différents facteurs créent un environnement qui a un effet sur des cellules immunitaires, mais qui ne récapitule pas forcément tout ce qui se passe *in vivo*. En effet, *in vivo*, les cytokines causent également d'autres effets au niveau de la muqueuse, tel

que le recrutement de cellules immunitaires, qui produisent à leur tour d'autres cytokines et l'effet final ne sera pas forcément celui rapporté dans le modèle *in vitro*. Ce modèle nous a donc permis de caractériser l'inflammation induite par les cellules épithéliales au cours d'une exposition à différents facteurs de l'environnement. Par ailleurs, *in vitro*, nous utilisons des neutrophiles isolés du sang périphérique pour caractériser l'impact de l'environnement muqueux sur leur phénotype et leurs fonctions. Cependant, le phénotype de ces neutrophiles pourrait différer des neutrophiles extravasés situés *in vivo* au niveau du TRF. Différents autres modèles de culture cellulaire, d'organoïde ou *ex vivo* ont été décrits et pourraient être utilisés pour mieux caractériser l'impact de la composition du microbiote vaginal ou du LS sur la réponse immunitaire et/ou sur la susceptibilité aux IST au niveau de la muqueuse^{448,498}. Cependant ces modèles ne récapitulent pas non plus complètement la muqueuse du TRF en conditions physiologique *in vivo*. D'où l'importance de réaliser, en parallèle de ces modèles, des études *in vivo*, qui donnent accès à la complexité du tissu. Les modèles précliniques relevant de l'espèce humaine sont donc importants et complémentaires pour comprendre des processus physiologiques, pathologiques ou encore pour tester des thérapies avant d'initier les phases d'essai clinique chez l'Homme. Dans ces modèles *in vivo*, il est également possible d'avoir accès aux organes du tractus reproducteur afin de localiser un agent pathogène. Par exemple, Houzet et al. ont été capables de déterminer l'origine de populations virales de SIV au niveau du LS en comparant ces populations de virus à celles présentes dans les différents organes du tractus reproducteur masculin de macaques cynomolgus⁴⁹⁹.

En effet, les macaques sont étudiés dans différents domaines de recherche, ils sont sensibles à un large spectre d'agents pathogènes qui infectent l'espèce humaine^{455,466}. Cette espèce de primates non humains présente des similitudes importantes avec l'Homme en termes de morphologie du TRF, de système immunitaire et de cycle menstruel^{458,461}. Le macaque cynomolgus est donc un modèle pertinent pour l'étude de la réponse immunitaire du TRF aux IST. Au cours de nos différentes études, nous avons choisi de ne pas perturber le cycle menstruel des macaques car plusieurs travaux ont montré que des contraceptifs pouvaient altérer les muqueuses du TRF, la composition du microbiote vaginal et la susceptibilité aux IST⁵⁰⁰⁻⁵⁰². Nous avons pu effectuer différents prélèvements permettant l'analyse du

microbiote vaginal (écouvillons), des médiateurs solubles (éponges pour les fluides) et des populations immunitaires présentes dans la lumière et en surface de l'épithélium cervicovaginal (cytobrosses), ou présentes dans la muqueuse (biopsies à l'euthanasie). Le planning des études a dû être étudié avec attention car, par exemple, les inoculations intravaginales ou les cytobrosses cervicovaginales peuvent induire d'une inflammation locale. Nous avons pu le constater dans l'étude *in vivo* (Article 3), où les animaux ont reçu une puis quatre doses intravaginales de PBS, et où différents prélèvements ont été réalisés : nous avons constaté une augmentation progressive de l'inflammation génitale, que l'on ne peut qu'attribuer à la manipulation des animaux. Nous avons montré que la production de cytokines cervicovaginales est très variable selon l'animal, certains animaux présentant une production de cytokines plus élevée que les autres. Ce modèle *in vivo* est donc également représentatif de la variabilité inter-individuelle présente au sein de l'espèce humaine.

Par ailleurs, le prélèvement des cytobrosses vaginales présente l'avantage d'être relativement peu invasif, mais nous avons pu constater qu'il ne donnait pas accès à l'intégralité des populations cellulaires de la muqueuse. Par exemple, les neutrophiles sont sur-représentés dans les cytobrosses. Cela nous a permis de les caractériser de manière fine au cours du cycle menstruel, à la suite d'une modification du microbiote vaginal, d'une exposition au LS et/ou à CT. D'autres populations de cellules immunitaires pourraient varier au cours du cycle menstruel, mais elles sont peu représentées dans les cytobrosses, et de par la limitation du nombre de cellules collectées par ce prélèvement, nous n'avons pas pu les étudier en parallèle des neutrophiles. Des variations du nombre de cellules NK ou de macrophages ont été décrites au cours du cycle dans l'endomètre par exemple⁶³. Il serait donc intéressant d'étudier la variation de ces cellules immunitaires localement, car l'évolution de leur phénotype n'est pas bien documentée au cours du cycle menstruel.

Les neutrophiles collectés à partir des cytobrosses cervicovaginales n'ont pas pu être utilisés dans des tests fonctionnels *in vitro* en raison de la fragilité de ces cellules. Nous avons cependant pu évaluer de manière indirecte leurs fonctions en dosant d'une part les NET dans les fluides cervicovaginaux collectés, et d'autre part en nous appuyant sur le modèle *in vitro*, qui permettait de tester d'autres fonctions des neutrophiles (survie, capacité de phagocytose et de production des ROS). *In vivo*, nous n'avons également pas été en mesure

de quantifier le nombre absolu de neutrophiles locaux dans le TRF car l'échantillonnage par cytobrosse vaginale ne peut pas être utilisé de manière quantitative. Au cours des différentes études *in vivo*, nous n'avons pas observé de changements significatifs dans la proportion de neutrophiles locaux parmi les cellules CD45+. Ceci pourrait suggérer l'absence de recrutement de neutrophiles. Cependant, le pourcentage élevé de neutrophiles au niveau des cytobrosses vaginales pourrait expliquer la difficulté de voir des augmentations de ce pourcentage.

3.2 Espèce humaine vs modèle macaque

Le modèle macaque, de par sa proximité avec l'Homme, est un modèle de choix en recherche préclinique. Il est susceptible à un grand nombre d'agents pathogènes infectant l'Homme, dont CT. Ceci est un avantage comparé à d'autres modèles animaux qui ne sont pas un hôte naturel pour l'infection CT. Cependant, le modèle macaque cynomolgus présente un certain nombre de divergences avec l'Homme qu'il convient de discuter. Par exemple, le microbiote vaginal de macaques en liberté est différent de celui d'animaux en captivité. Ces divergences pourraient provenir d'une différence d'activité sexuelle : en captivité, les macaques sont disposés en groupes sociaux de même sexe. L'activité sexuelle a également un impact sur les réponses immunitaires. Par ailleurs, la femme est la seule mammifère à posséder un microbiote vaginal dominé par des espèces de *Lactobacillus*. La faible présence de *Lactobacillus* chez les macaques est associée à un faible niveau vaginal de glycogène et d'acide lactique, qui pourrait provenir d'une alimentation pauvre en amidon. Ces différences dans la composition du microbiote vaginal montrent que le modèle macaque ne récapitule pas le microbiote vaginal optimal des femmes, dominé par une espèce de *Lactobacillus*. Il représente en revanche celui des femmes présentant un microbiote vaginal de type CST IVa, dominé par des bactéries anaérobies (dysbiose) et associé à une plus forte susceptibilité à différentes pathologies. Par conséquent, le macaque cynomolgus est un bon modèle préclinique pour l'étude des pathologies de la santé sexuelle.

Cette différence de microbiote vaginal entre le macaque et la femme peut néanmoins expliquer la difficulté de maintenir une souche bactérienne provenant du microbiote humain au niveau du TRF macaque. En effet, dans l'étude *in vivo* mettant en place un modèle

d'enrichissement du microbiote vaginal en *L. crispatus* (Annexe 1), la souche que nous avons utilisée provient d'un microbiote humain, et ne persistait pas au niveau du microbiote vaginal, d'où la nécessité de l'inoculer de manière répétée. Cette étude montre donc la complexité qu'il peut y avoir à tester en préclinique des souches à potentiel probiotique, visant à diminuer l'inflammation génitale ou la susceptibilité aux IST. Lorsqu'il n'est pas possible de tester le potentiel de telles souches directement chez l'Homme, les modèles *in vitro* des muqueuses du TRF humain sont donc des outils complémentaires indispensables, qui peuvent justifier du potentiel probiotique d'une souche chez l'Homme, et motiver la recherche clinique.

De manière comparable, nous avons étudié l'effet d'un pool de LS humain au niveau du TRF macaque. Nous n'avons pas pu utiliser de LS macaque car la quantité de LS pouvant être collectée chez le macaque est relativement limitée. De nombreuses études *in vivo* ont montré que les fonctions du LS étaient assez transversales au niveau des mammifères : le LS entraîne notamment le recrutement et l'activation des fonctions des neutrophiles, importants entre autres pour le processus de fertilisation. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'induction de l'inflammation peuvent différer entre les espèces, d'où l'importance du modèle *in vitro* complémentaire.

Pour conclure, les modèles présentés diffèrent et sont complémentaires. Les modèles pré-cliniques tels que le macaque cynomolgus sont pertinents pour la clinique humaine. Ils permettent d'évaluer dans un système contrôlé les effets des différents facteurs de l'environnement du TRF sur l'inflammation, dans un contexte physiologique, ou pathologique comme par exemple au cours d'IST. Les modèles *in vitro* offrent une approche mécanistique qui permet d'élucider le rôle des différents facteurs de manière séquentielle. Les approches combinatoires utilisant des systèmes *in vitro* et *in vivo* seront nécessaires pour répondre aux questions fondamentales restantes autour du rôle des facteurs de l'environnement sur l'inflammation génitale et la susceptibilité aux IST au niveau du TRF.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, au cours de cette thèse, nous avons pu :

(1) Mettre en évidence l'impact des menstruations au niveau du TRF *in vivo* dans un modèle préclinique, le macaque cynomolgus : elles induisent une variation de la composition du microbiote vaginal, une augmentation de la concentration de cytokines et une accumulation de neutrophiles matures/activés au niveau cervicovaginal. Ces données soulignent l'importance de prendre en compte le cycle menstruel dans les études portant sur l'immunité au niveau du TRF.

(2) Etudier l'impact du LS sur l'inflammation dans un modèle macaque cynomolgus et son impact sur l'infection CT. Nous avons mis en évidence les propriétés pro et anti-inflammatoires du LS sur la production de cytokines au niveau des muqueuses et potentiellement sur une des fonctions des neutrophiles : la production de NET. Nous avons caractérisé la réponse immunitaire à l'infection CT et montré que le LS affecte cette réponse. En particulier, l'infection CT pourrait entraîner un recrutement de cellules immunitaires au niveau du TRF et ce recrutement pourrait avoir des conséquences pour l'acquisition d'autres IST (co-infections).

(3) Etablir un modèle *in vitro* permettant d'étudier, au niveau des muqueuses du TRF, l'effet du LS sur les cellules épithéliales, sur l'acquisition d'IST et sur les cellules immunitaires. Différents profils transcriptomique, d'expression de cytokines et de pourcentage d'infection ont été caractérisés en fonction des conditions expérimentales (CT \pm différentes dilutions de LS). De plus, nous avons pu montrer que l'environnement créé par les cellules épithéliales dans les différentes conditions a un impact sur le phénotype et les fonctions des neutrophiles.

(4) Tester l'effet de bactéries du microbiote vaginal sur les cellules épithéliales endocervicales dans le modèle *in vitro*. Ainsi, nous avons pu étudier leur effet sur des populations de cellules immunitaires et la susceptibilité aux IST. Nous avons montré des profils de cytokines différents en fonction des conditions expérimentales (CT \pm *L. crispatus*

ou *G. vaginalis*). De plus, nous avons décrit une modification du phénotype et de la survie des neutrophiles en fonction de la bactérie utilisée. *G. vaginalis* affecte aussi la susceptibilité à l'infection par le VIH-1.

Ce projet s'est concentré sur le rôle des facteurs de l'environnement du TRF et leur impact sur le contrôle de l'inflammation locale et la susceptibilité aux IST. Il a permis de mettre en évidence que l'environnement du TRF est complexe et que ses facteurs interagissent ensemble. Nous avons contribué à l'amélioration des connaissances en caractérisant pour la première fois les différentes sous-populations de neutrophiles cervicovaginaux. Nous avons aussi démontré pour la première fois qu'un pool de LS modérément inflammatoire inhibe l'infection CT de cellules épithéliales du TRF *in vitro*. Les modèles *in vivo* mis en place seront nécessaires pour mieux caractériser l'impact des facteurs de l'environnement du TRF sur l'inflammation dans différents contextes physiologiques ou pathologiques. Il est important de mieux comprendre le rôle de l'environnement local sur l'inflammation afin de prévenir un certain nombre de pathologies, notamment pour réduire la susceptibilité aux IST. Les principales perspectives du projet de thèse sont résumées Figure 36.

In vitro, nous avons concentré notre analyse sur deux bactéries qui ont un rôle central dans l'inflammation chez l'Homme. Cependant, deux bactéries ne peuvent pas récapituler l'ensemble des communautés présentes au niveau du microbiote vaginal. Le microbiote vaginal humain est composé d'un large éventail de bactéries, et même s'il est souvent dominé par une espèce de *Lactobacillus*, les souches isolées chez différentes femmes peuvent posséder des propriétés très différentes. Pour mieux reproduire le microbiote humain, le modèle *in vitro* pourrait donc être amélioré en utilisant un ensemble de bactéries provenant d'écouvillons vaginaux prélevés chez des femmes possédant un microbiote optimal, ou au contraire présentant une BV.

Il serait également intéressant de pouvoir exploiter le potentiel probiotique des souches de lactobacilles. Au laboratoire, un projet va être mené dans ce sens par une ingénieure de recherche (Arthi Rajasekaran), en lien avec une ancienne post-doctorante de l'équipe (Natalia Nunez-Fernandez) travaillant actuellement pour la compagnie Life & Soft.

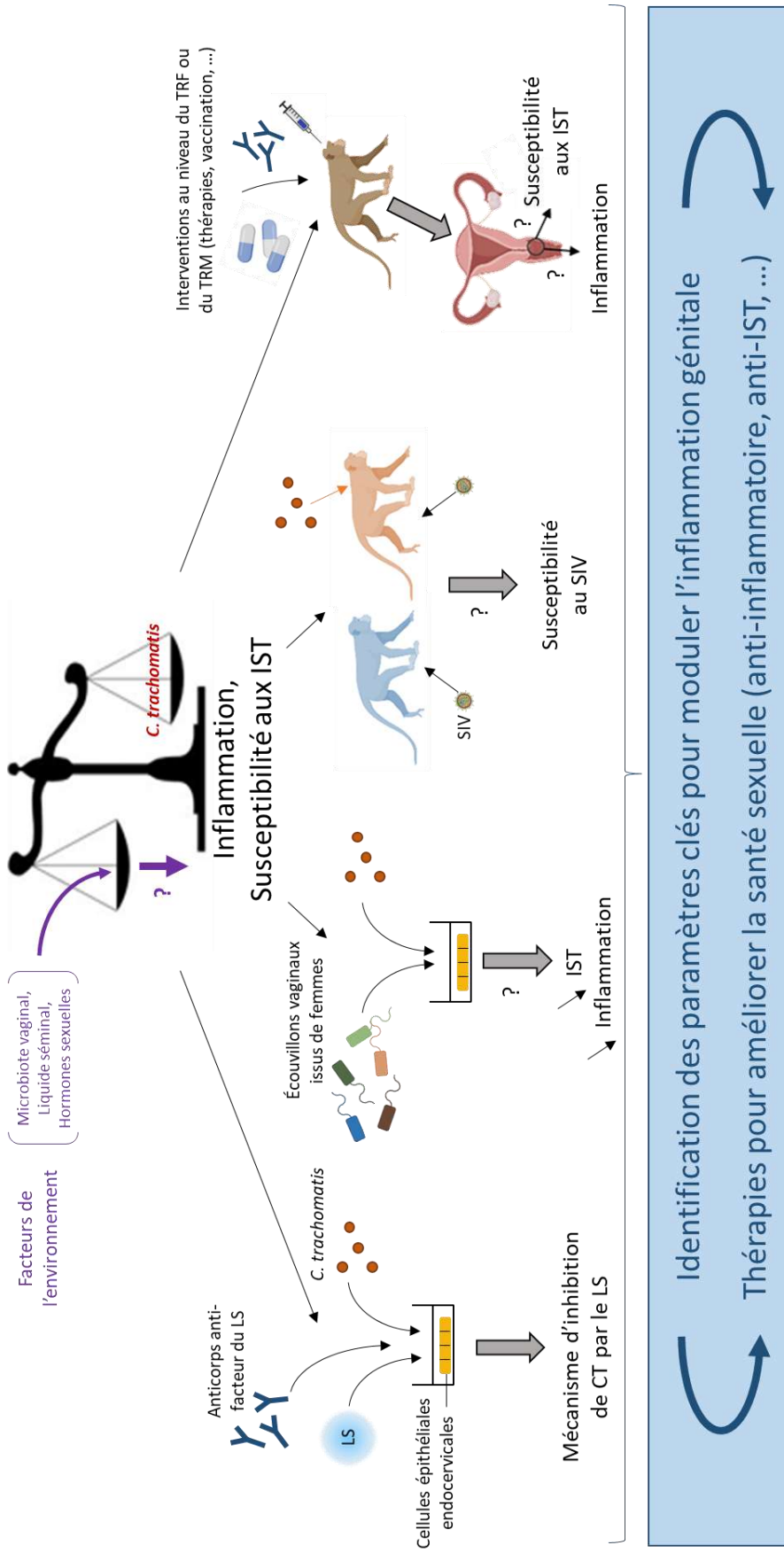


Figure 36 : Schéma des principales perspectives de la thèse. Les données obtenues au cours de la thèse offrent des perspectives d'expériences *in vitro* et *in vivo*, visant à mieux comprendre le rôle des facteurs de l'environnement du TRF, notamment le microbiote vaginal et le LS, dans la modulation de l'inflammation génitale et de la susceptibilité aux IST. Ce travail permettra à terme de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour contrôler l'inflammation génitale et diminuer le risque d'acquisition d'IST.

L'objectif de ce projet est d'isoler des souches de lactobacilles à partir du microbiote vaginal, puis de sélectionner une de ces souches pour ses propriétés optimales anti-inflammatoires et anti-Chlamydia. Cette souche pourrait notamment être testée dans le modèle *in vitro* pour étudier sa capacité probiotique à adhérer aux cellules épithéliales, à induire un environnement cytokines anti-inflammatoire, à produire de l'acide lactique, à modifier la susceptibilité à l'infection CT... L'objectif sera ensuite de pouvoir utiliser cette souche en préclinique puis en clinique en tant que probiotique comme anti-inflammatoire et protectrice contre l'acquisition de CT et potentiellement d'autres IST.

Par ailleurs, nous avons étudié un autre facteur de l'environnement : le LS. Nous avons montré que le LS inhibe l'infection CT. Il serait intéressant d'étudier plus en profondeur les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'infection par CT par le LS *in vitro*. Dans un premier temps, nous allons tester l'effet de différents LS isolés (peu ou très inflammatoires) dans le modèle *in vitro*, et comparer leur effet à celui du pool de LS (modérément inflammatoire). Nous testerons leur effet sur la susceptibilité à l'infection CT et sur la modulation de l'inflammation induite par l'infection CT. Dans un second temps, nous essaierons de corréliser les différentes données obtenues sur les cellules A2EN (production de cytokines et susceptibilité à CT) avec la composition des LS isolés. Nous pourrions par la suite utiliser des anticorps dirigés contre des facteurs présents dans le LS (afin de neutraliser une cytokine, ou un autre facteur) et d'élucider leur rôle dans l'inhibition de l'infection par CT.

Il serait aussi intéressant de tester la susceptibilité de l'infection VIH-1 en présence des surnageants de cellules A2EN dans les différentes conditions expérimentales sur des cellules fraîchement isolées du TRF qui sont susceptibles à l'infection VIH-1 comme notre équipe l'a montré (Benjelloun et al., non publié). Un isolat primaire tel que le VIH-1BaL pourrait être utilisé dans une telle expérience.

Une autre perspective de ce travail de thèse serait l'étude *in vivo* de la co-infection CT/SIV. Nous avons montré *in vivo* que l'infection CT en présence de LS entraînait un recrutement de cellules cibles du VIH-1. De plus, de nombreuses études épidémiologiques montrent une susceptibilité accrue au VIH-1 en cas de pré-infection par CT. Il serait donc intéressant de

voir si les femelles macaques cynomolgus infectées par CT présentent une susceptibilité accrue à l'infection SIV par rapport à des femelles non infectées par CT. La réponse immunitaire à l'infection SIV pourrait être alors également étudiée et corrélée avec les données obtenues dans l'étude pilote *in vivo* concernant l'effet du LS sur l'infection CT présentée dans cette thèse.

En conclusion, ce projet a permis de mieux caractériser le rôle de facteurs de l'environnement du TRF sur l'inflammation génitale et la susceptibilité aux IST. Il démontre que l'environnement du TRF est complexe : de nombreux facteurs interagissent entre eux et avec la muqueuse. Dans la continuité des données présentées dans cette thèse, différentes expériences doivent être menées pour prouver que l'inflammation génitale peut être modulée en intervenant sur les facteurs de l'environnement du TRF, et par conséquent qu'il est possible de réduire le risque d'acquisition d'IST associé à l'augmentation de l'inflammation génitale. Ce projet ouvre des voies pour le développement de nouvelles thérapies (probiotiques, thérapies ciblant les neutrophiles, ...) contre les IST et d'autres problèmes liés à la santé reproductive.

BIBLIOGRAPHIE

1. Santé Publique France. <https://www.santepubliquefrance.fr/>.
2. Rowley, J. *et al.* Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ* **97**, (2019).
3. Jean-Michel Molina. Séminaire ANRS - 25/11/19 - Actualités de l'ANRS - session 1. <https://www.youtube.com/watch?v=8-EGt2neg6M&t=240s>.
4. Hickey, D. K., Patel, M. v., Fahey, J. v. & Wira, C. R. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol* **88**, 185–194 (2011).
5. Roy, A. & Matzuk, M. M. Reproductive tract function and dysfunction in women. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 517–525 (2011).
6. Cunha, G. R. *et al.* Reproductive tract biology: Of mice and men. *Differentiation* **110**, 49–63 (2019).
7. Mao, M., Li, Y., Zhang, Y., Kang, J. & Zhu, L. Tissue Composition and Biomechanical Property Changes in the Vaginal Wall of Ovariectomized Young Rats. *Biomed Res Int* **2019**, (2019).
8. Wira, C. R., Fahey, J. v., Sentman, C. L., Pioli, P. A. & Shen, L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* **206**, 306–335 (2005).
9. Wira, C. R., Rodriguez-Garcia, M. & Patel, M. v. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nature Reviews Immunology* **2015** *15*:4 **15**, 217–230 (2015).
10. de Tomasi, J. B., Opata, M. M. & Mowa, C. N. Immunity in the Cervix: Interphase between Immune and Cervical Epithelial Cells. *J Immunol Res* **2019**, (2019).
11. Ramanathan, R. & Woodrow, K. Engineering immunity in the mucosal niche against sexually transmitted infections. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **8**, 107–122 (2016).
12. Liu, H., Huang, X., Mor, G. & Liao, A. Epigenetic modifications working in the decidualization and endometrial receptivity. *Cell Mol Life Sci* **77**, 2091–2101 (2020).
13. Wira, C. R., Grant-Tschudy, K. S. & Crane-Godreau, M. A. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am J Reprod Immunol* **53**, 65–76 (2005).
14. Fahey, J. v., Kaushic, C. & Wira, C. R. Human Uterine Epithelial Cells: Influence of culture conditions and stromal cells on epithelial cell transepithelial cell resistance. *Reproductive Immunology* 366–378 (1999) doi:10.1007/978-94-011-4197-0_38.
15. Cole, A. Innate Host Defense of Human Vaginal and Cervical Mucosae. *J Low Genit Tract Dis* **11**, 129–130 (2007).
16. Andersch-Björkman, Y., Thomsson, K. A., Holmén Larsson, J. M., Ekerhovd, E. & Hansson, G. C. Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Mol Cell Proteomics* **6**, 708–716 (2007).
17. Gipson, I. K. *et al.* Mucin Genes Expressed by Human Female Reproductive Tract Epithelia. *Biol Reprod* **56**, 999–1011 (1997).
18. CR, W. & RM, R. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of the estrous cycle on antigen presentation by uterine epithelial and stromal cells. *Endocrinology* **136**, 4526–4534 (1995).
19. Wira, C. R. & Rossoll, R. M. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of sex hormones on antigen presentation in the vagina. *Immunology* **84**, 505 (1995).

20. Ng, K. Y. B., Mingels, R., Morgan, H., Macklon, N. & Cheong, Y. In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Hum Reprod Update* **24**, 15–34 (2018).
21. Farage, M. A., Miller, K. W. & Gerberick, G. F. Innate Immunity in the Lower Female Mucosal Tract. *J Steroids Horm Sci* **02**, (2011).
22. Deng, S. *et al.* Recent advances in the role of toll-like receptors and TLR agonists in immunotherapy for human glioma. *Protein Cell* **5**, 899–911 (2014).
23. Zhong, Y., Kinio, A. & Saleh, M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol* **4**, (2013).
24. Kell, A. M. & Gale, M. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* **479**, 110 (2015).
25. Benjelloun, F. *et al.* Activation of Toll-Like Receptors Differentially Modulates Inflammation in the Human Reproductive Tract: Preliminary Findings. *Front Immunol* **11**, 1655 (2020).
26. Amjadi, F., Salehi, E., Mehdizadeh, M. & Aflatoonian, R. Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Adv Biomed Res* **3**, 1 (2014).
27. Fazeli, A., Bruce, C. & Anumba, D. O. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Hum Reprod* **20**, 1372–1378 (2005).
28. Yarbrough, V. L., Winkle, S. & Herbst-Kralovetz, M. M. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Hum Reprod Update* **21**, 353–377 (2015).
29. Hart, K. M. *et al.* Functional expression of pattern recognition receptors in tissues of the human female reproductive tract. *J Reprod Immunol* **80**, 33–40 (2009).
30. Arnold, K. B. *et al.* Increased levels of inflammatory cytokines in the female reproductive tract are associated with altered expression of proteases, mucosal barrier proteins, and an influx of HIV-susceptible target cells. *Mucosal Immunol* **9**, 194–205 (2016).
31. Negishi, H., Taniguchi, T. & Yanai, H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).
32. Cumming, H. E. & Bourke, N. M. Type I IFNs in the female reproductive tract: The first line of defense in an ever-changing battleground. *J Leukoc Biol* **105**, 353–361 (2019).
33. Todd, S. & Naylor, S. L. New chromosomal mapping assignments for argininosuccinate synthetase pseudogene 1, interferon-beta 3 gene, and the diazepam binding inhibitor gene. *Somat Cell Mol Genet* **18**, 381–385 (1992).
34. Demers, A. *et al.* The mucosal expression pattern of interferon- ϵ in rhesus macaques. *J Leukoc Biol* **96**, 1101 (2014).
35. Fan, S. R., Liu, X. P. & Liao, Q. P. Human defensins and cytokines in vaginal lavage fluid of women with bacterial vaginosis. *Int J Gynaecol Obstet* **103**, 50–54 (2008).
36. Lee, A. J. & Ashkar, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol* **9**, (2018).
37. Cho, A. *et al.* Protective effects of red ginseng extract against vaginal herpes simplex virus infection. *J Ginseng Res* **37**, 210 (2013).
38. Day, P. M., Thompson, C. D., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Interferon Gamma Prevents Infectious Entry of Human Papillomavirus 16 via an L2-Dependent Mechanism. *J Virol* **91**, (2017).
39. Iversen, M. B., Ank, N., Melchjorsen, J. & Paludan, S. R. Expression of type III interferon (IFN) in the vaginal mucosa is mediated primarily by dendritic cells and displays stronger dependence on NF-kappaB than type I IFNs. *J Virol* **84**, 4579–4586 (2010).
40. Caine, E. A. *et al.* Interferon lambda protects the female reproductive tract against Zika virus infection. *Nature Communications 2019 10:1* **10**, 1–12 (2019).
41. Patel, M. v., Hopkins, D. C., Barr, F. D. & Wira, C. R. Sex Hormones and Aging Modulate Interferon Lambda 1 Production and Signaling by Human Uterine Epithelial Cells and

- Fibroblasts. *Front Immunol* **12**, (2021).
42. Bourke, N. M. *et al.* Spatiotemporal regulation of human IFN- ϵ and innate immunity in the female reproductive tract. *JCI Insight* **7**, (2022).
 43. Broggi, A., Granucci, F. & Zanoni, I. Type III interferons: Balancing tissue tolerance and resistance to pathogen invasion. *Journal of Experimental Medicine* **217**, (2020).
 44. Boomsma, C. M. *et al.* Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online* **18**, 85–94 (2009).
 45. Kyongo, J. K. *et al.* Searching for lower female genital tract soluble and cellular biomarkers: defining levels and predictors in a cohort of healthy Caucasian women. *PLoS One* **7**, (2012).
 46. Lieberman, J. A., Moscicki, A. B., Sumerel, J. L., Ma, Y. & Scott, M. E. Determination of cytokine protein levels in cervical mucus samples from young women by a multiplex immunoassay method and assessment of correlates. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 49–54 (2008).
 47. Kany, S., Vollrath, J. T. & Relja, B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
 48. Dinarello, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* **281**, 8–27 (2018).
 49. Viganò, P., Cintorino, M., Schatz, F., Lockwood, C. J. & Arcuri, F. The role of macrophage migration inhibitory factor in maintaining the immune privilege at the fetal-maternal interface. *Semin Immunopathol* **29**, 135–150 (2007).
 50. Gargiulo, A. R., Fichorova, R. N., Politch, J. A., Hill, J. A. & Anderson, D. J. Detection of implantation-related cytokines in cervicovaginal secretions and peripheral blood of fertile women during ovulatory menstrual cycles. *Fertil Steril* **82 Suppl 3**, 1226–1234 (2004).
 51. Rancez, M., Couëdel-Courteille, A. & Cheyrier, R. Chemokines at mucosal barriers and their impact on HIV infection. *Cytokine Growth Factor Rev* **23**, 233–243 (2012).
 52. Lasarte, S. *et al.* Sex Hormones Coordinate Neutrophil Immunity in the Vagina by Controlling Chemokine Gradients. *J Infect Dis* **213**, 476–484 (2016).
 53. Ahmadi, Z., Arababadi, M. K. & Hassanshahi, G. CXCL10 activities, biological structure, and source along with its significant role played in pathophysiology of type I diabetes mellitus. *Inflammation* **36**, 364–371 (2013).
 54. Ravindranath, N., Little-Ihrig, L., Phillips, H. S., Ferrara, N. & Zeleznik, A. J. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* **131**, 254–260 (1992).
 55. Shweiki, D., Itin, A., Neufeld, G., Gitay-Goren, H. & Keshet, E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* **91**, 2235 (1993).
 56. Spiekermann, K. *et al.* Altered surface marker expression and function of G-CSF-induced neutrophils from test subjects and patients under chemotherapy. *Br J Haematol* **87**, 31–38 (1994).
 57. Gasson, J. C. Molecular Physiology of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* **77**, 1131–1145 (1991).
 58. Huttner, K. M. & Bevins, C. L. Antimicrobial Peptides as Mediators of Epithelial Host Defense. *Pediatric Research* 1999 45:6 **45**, 785–794 (1999).
 59. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 710–720 (2003).
 60. Tjabringa, G. S. *et al.* Host defense effector molecules in mucosal secretions. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**, 151–158 (2005).
 61. Valenti, P. *et al.* Role of Lactobacilli and Lactoferrin in the Mucosal Cervicovaginal Defense. *Front Immunol* **9**, (2018).
 62. Fraser, I. P., Koziel, H. & Ezekowitz, R. A. B. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and

- adaptive immunity. *Semin Immunol* **10**, 363–372 (1998).
63. Lee, S. K., Kim, C. J., Kim, D.-J. & Kang, J. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw* **15**, 16 (2015).
 64. Wira, C. R., Patel, M. v., Ghosh, M., Mukura, L. & Fahey, J. v. Innate immunity in the human female reproductive tract: endocrine regulation of endogenous antimicrobial protection against HIV and other sexually transmitted infections. *Am J Reprod Immunol* **65**, 196–211 (2011).
 65. Strbo, N. *et al.* Loss of intraepithelial endocervical gamma delta (GD) 1 T cells in HIV infected women. *Am J Reprod Immunol* **75**, 134 (2016).
 66. Gibbs, A. *et al.* MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation. *Mucosal Immunol* **10**, 35–45 (2017).
 67. Duluc, D. *et al.* Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses. *Mucosal Immunology* 2013 6:3 **6**, 626–638 (2012).
 68. Duluc, D. *et al.* Transcriptional fingerprints of antigen-presenting cell subsets in the human vaginal mucosa and skin reflect tissue-specific immune microenvironments. *Genome Med* **6**, 1–16 (2014).
 69. Jensen, A. L. *et al.* A subset of human uterine endometrial macrophages is alternatively activated. *Am J Reprod Immunol* **68**, 374–386 (2012).
 70. Shen, R. *et al.* Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **83**, 3258–3267 (2009).
 71. Jameson, B. *et al.* Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* **76**, 1866–1875 (2002).
 72. Mestecky, J., Moldoveanu, Z., Smith, P. D., Hel, Z. & Alexander, R. C. Mucosal immunology of the genital and gastrointestinal tracts and HIV-1 infection. *J Reprod Immunol* **83**, 196–200 (2009).
 73. Manaster, I. & Mandelboim, O. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* **63**, 434–444 (2010).
 74. Mselle, T. F. *et al.* Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. *Clin Immunol* **124**, 69–76 (2007).
 75. Schulke, L., Manconi, F., Markham, R. & Fraser, I. S. Endometrial dendritic cell populations during the normal menstrual cycle. *Hum Reprod* **23**, 1574–1580 (2008).
 76. Rodriguez-Garcia, M., Barr, F. D., Crist, S. G., Fahey, J. v. & Wira, C. R. Phenotype and susceptibility to HIV infection of CD4+ Th17 cells in the human female reproductive tract. *Mucosal Immunol* **7**, 1375–1385 (2014).
 77. Rodriguez-Garcia, M. *et al.* Dendritic cells from the human female reproductive tract rapidly capture and respond to HIV. *Mucosal Immunology* 2017 10:2 **10**, 531–544 (2016).
 78. Trifonova, R. T., Lieberman, J. & van Baarle, D. Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission. *Am J Reprod Immunol* **71**, 252–264 (2014).
 79. Monin, L., Whettlock, E. M. & Male, V. Immune responses in the human female reproductive tract. *Immunology* **160**, 106–115 (2020).
 80. Shaw, J. L. V. *et al.* Lymphoid and myeloid cell populations in the non-pregnant human Fallopian tube and in ectopic pregnancy. *J Reprod Immunol* **89**, 84–91 (2011).
 81. Sathaliyawala, T. *et al.* Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* **38**, 187–197 (2013).
 82. Weisel, N. M. *et al.* Surface phenotypes of naive and memory B cells in mouse and human tissues. *Nature Immunology* 2021 23:1 **23**, 135–145 (2021).
 83. Rosser, E. C. & Mauri, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* **42**, 607–612 (2015).
 84. Rodriguez-Garcia, M., Fortier, J. M., Barr, F. D. & Wira, C. R. Aging impacts CD103 + CD8 +

- T cell presence and induction by dendritic cells in the genital tract. *Aging Cell* **17**, (2018).
85. Vine, E. E. *et al.* HIV transmitting mononuclear phagocytes; integrating the old and new. *Mucosal Immunol* **15**, (2022).
 86. Feyaerts, D. *et al.* Endometrial natural killer (NK) cells reveal a tissue-specific receptor repertoire. *Hum Reprod* **33**, 441–451 (2018).
 87. Sentman, C. L., Wira, C. R. & Eriksson, M. NK cell function in the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* **57**, 108–115 (2007).
 88. Yvan-Charvet, L. & Ng, L. G. Granulopoiesis and Neutrophil Homeostasis: A Metabolic, Daily Balancing Act. *Trends Immunol* **40**, 598–612 (2019).
 89. Ng, L. G., Ostuni, R. & Hidalgo, A. Heterogeneity of neutrophils. *Nature Reviews Immunology* 2019 19:4 **19**, 255–265 (2019).
 90. Jilma, B. *et al.* Circadian variation of granulocyte colony stimulating factor levels in man. *Br J Haematol* **106**, 368–370 (1999).
 91. Hidalgo, A., Chilvers, E. R., Summers, C. & Koenderman, L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol* **40**, 584–597 (2019).
 92. Cassatella, M. A., Östberg, N. K., Tamassia, N. & Soehnlein, O. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends Immunol* **40**, 648–664 (2019).
 93. Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P. & Eitzen, G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol* **5**, 448 (2014).
 94. Evrard, M. *et al.* Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity* **48**, 364–379.e8 (2018).
 95. Hsueh, L., Molino, J. & Mermel, L. Elevated bands as a predictor of bloodstream infection and in-hospital mortality. *Am J Emerg Med* **0**, 205–208 (2021).
 96. Sheppard, F. R. *et al.* Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* **78**, 1025–1042 (2005).
 97. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
 98. Vogt, K. L., Summers, C., Chilvers, E. R. & Condliffe, A. M. Priming and de-priming of neutrophil responses in vitro and in vivo. *Eur J Clin Invest* **48 Suppl 2**, (2018).
 99. Godaly, G., Proudfoot, A. E. I., Offord, R. E., Svanborg, C. & Agace, W. W. Role of epithelial interleukin-8 (IL-8) and neutrophil IL-8 receptor A in Escherichia coli-induced transuroepithelial neutrophil migration. *Infect Immun* **65**, 3451–3456 (1997).
 100. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2011 11:8 **11**, 519–531 (2011).
 101. Tecchio, C., Micheletti, A. & Cassatella, M. A. Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Front Immunol* **5**, 508 (2014).
 102. Yano, J. *et al.* The acute neutrophil response mediated by S100 alarmins during vaginal Candida infections is independent of the Th17-pathway. *PLoS One* **7**, (2012).
 103. Gougerot-Podicalo, M. A., Elbim, C. & Chollet-Martin, S. Modulation de l'explosion oxydative des polynucleaires neutrophiles humains par les cytokines pro- et anti-inflammatoires. *Pathologie Biologie* **44**, 36–41 (1996).
 104. Niedergang, F. & Grinstein, S. How to build a phagosome: new concepts for an old process. *Curr Opin Cell Biol* **50**, 57–63 (2018).
 105. DeLeo, F. R. & Allen, L.-A. H. Phagocytosis and neutrophil extracellular traps. *Fac Rev* **9**, (2020).
 106. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* **9**, 181–218 (2014).
 107. Granger, V., de Chaisemartin, L. & Chollet-Martin, S. [Miraculous catch by neutrophils NETs].

- Med Sci (Paris)* **30**, 544–549 (2014).
108. Barr, F. D., Ochsenbauer, C., Wira, C. R. & Rodriguez-Garcia, M. Neutrophil extracellular traps prevent HIV infection in the female genital tract. *Mucosal Immunology* **2018 11:5** **11**, 1420–1428 (2018).
 109. Phillipson, M. & Kubes, P. The Healing Power of Neutrophils. *Trends Immunol* **40**, 635–647 (2019).
 110. Leliefeld, P. H. C., Koenderman, L. & Pillay, J. How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Front Immunol* **6**, (2015).
 111. Marini, O. *et al.* Mature CD10⁺ and immature CD10⁻ neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* **129**, 1343–1356 (2017).
 112. Langereis, J. D. *et al.* Spleen-derived IFN- γ induces generation of PD-L1⁺-suppressive neutrophils during endotoxemia. *J Leukoc Biol* **102**, 1401–1409 (2017).
 113. Ley, K., Smith, E. & Stark, M. A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res* **34**, 229–242 (2006).
 114. Parsa, R. *et al.* BAFF-secreting neutrophils drive plasma cell responses during emergency granulopoiesis. *Journal of Experimental Medicine* **213**, 1537–1553 (2016).
 115. Huard, B. *et al.* APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest* **118**, 2887–2895 (2008).
 116. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z. G., Glogauer, M. & Scapini, P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol* **40**, 565–583 (2019).
 117. Nicolás-Ávila, J. Á., Adrover, J. M. & Hidalgo, A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity* **46**, 15–28 (2017).
 118. Smith, J. M., Wira, C. R., Fanger, M. W. & Shen, L. Human fallopian tube neutrophils--a distinct phenotype from blood neutrophils. *Am J Reprod Immunol* **56**, 218–229 (2006).
 119. Pudney, J., Quayle, A. J. & Anderson, D. J. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod* **73**, 1253–1263 (2005).
 120. Yüzen, D., Arck, P. C. & Thiele, K. Tissue-resident immunity in the female and male reproductive tract. *Seminars in Immunopathology* **2022** 1–15 (2022) doi:10.1007/S00281-022-00934-8.
 121. Beq, S. *et al.* Injection of glycosylated recombinant simian IL-7 provokes rapid and massive T-cell homing in rhesus macaques. *Blood* **114**, 816–825 (2009).
 122. Yeaman, G. R. *et al.* Unique CD8⁺ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine endometrium. *J Leukoc Biol* **61**, 427–435 (1997).
 123. Givan, A. L. *et al.* Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol* **38**, 350–359 (1997).
 124. Johansson, E. L., Rudin, A., Wassén, L. & Holmgren, J. Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. *Immunology* **96**, 272 (1999).
 125. Salamonsen, L. A. & Lathbury, L. J. Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update* **6**, 16–27 (2000).
 126. Oh, J. E. *et al.* Migrant memory B cells secrete luminal antibody in the vagina. *Nature* **2019 571:7763** **571**, 122–126 (2019).
 127. Johansson, M. & Lycke, N. Y. Immunology of the human genital tract. *Curr Opin Infect Dis* **16**, 43–49 (2003).
 128. The fine structure of the mature human endometrium. *The Endometrium* 84–103 (2008) doi:10.3109/9780203091500-9.
 129. Grant-Tschudy, K. S. & Wira, C. R. Effect of estradiol on mouse uterine epithelial cell transepithelial resistance (TER). *Am J Reprod Immunol* **52**, 252–262 (2004).
 130. Kaushic, C., Frauendorf, E. & Wira, C. R. Polymeric immunoglobulin a receptor in the rodent

- female reproductive tract: Influence of estradiol in the vagina and differential expression of messenger ribonucleic acid during estrous cycle. *Biol Reprod* **57**, 958–966 (1997).
131. Reis Machado, J. *et al.* Mucosal Immunity in the Female Genital Tract, HIV/AIDS. *Biomed Res Int* **2014**, (2014).
 132. Starkey, P. M., Clover, L. M. & Rees, M. C. P. Variation during the menstrual cycle of immune cell populations in human endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **39**, 203–207 (1991).
 133. Wira, C. R., Fahey, J. v., Rodriguez-Garcia, M., Shen, Z. & Patel, M. v. Regulation of mucosal immunity in the female reproductive tract: the role of sex hormones in immune protection against sexually transmitted pathogens. *Am J Reprod Immunol* **72**, 236–258 (2014).
 134. Armstrong, G. M. *et al.* Endometrial apoptosis and neutrophil infiltration during menstruation exhibits spatial and temporal dynamics that are recapitulated in a mouse model. *Sci Rep* **7**, (2017).
 135. Sasaki, S., Nagata, K. & Kobayashi, Y. Regulation of the estrous cycle by neutrophil infiltration into the vagina. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 35–40 (2009).
 136. Salinas-Muñoz, L. *et al.* Estrogen receptor-alpha (ESR1) governs the lower female reproductive tract vulnerability to *Candida albicans*. *Front Immunol* **9**, 1033 (2018).
 137. Wira, C. R. *et al.* Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am J Reprod Immunol* **63**, 544–565 (2010).
 138. Aflatoonian, R. & Fazeli, A. Toll-like receptors in female reproductive tract and their menstrual cycle dependent expression. *J Reprod Immunol* **77**, 7–13 (2008).
 139. Aflatoonian, R. *et al.* Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. *Hum Reprod* **22**, 586–593 (2007).
 140. Lai, S. K., Wang, Y. Y., Wirtz, D. & Hanes, J. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 86–100 (2009).
 141. Boily-Larouche, G. *et al.* Characterization of the Genital Mucosa Immune Profile to Distinguish Phases of the Menstrual Cycle: Implications for HIV Susceptibility. *J Infect Dis* **219**, 856–866 (2019).
 142. Al-Harthi, L. *et al.* The Impact of the Ovulatory Cycle on Cytokine Production: Evaluation of Systemic, Cervicovaginal, and Salivary Compartments. <https://home.liebertpub.com/jir> **20**, 719–724 (2004).
 143. Francis, S. C. *et al.* Immune Activation in the Female Genital Tract: Expression Profiles of Soluble Proteins in Women at High Risk for HIV Infection. *PLoS One* **11**, (2016).
 144. Variations in free secretory component levels in mucosal secretions of the rat. | The Journal of Immunology. <https://www.jimmunol.org/content/130/3/1330>.
 145. Kutteh, W. H., Prince, S. J., Hammond, K. R., Kutteh, C. C. & Mestecky, J. Variations in immunoglobulins and IgA subclasses of human uterine cervical secretions around the time of ovulation. *Clin Exp Immunol* **104**, 538–542 (1996).
 146. Lima, M. T. *et al.* Virus and microbiota relationships in humans and other mammals: An evolutionary view. *Hum Microb J* **11**, 100050 (2019).
 147. Wang, J. *et al.* Translocation of vaginal microbiota is involved in impairment and protection of uterine health. *Nature Communications* **2021 12:1** **12**, 1–15 (2021).
 148. Smith, S. B. & Ravel, J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol* **595**, 451–463 (2017).
 149. Happel, A. U., Varsani, A., Balle, C., Passmore, J. A. & Jaspan, H. The Vaginal Virome-Balancing Female Genital Tract Bacteriome, Mucosal Immunity, and Sexual and Reproductive Health Outcomes? *Viruses* **12**, (2020).
 150. Ravel, J. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4680–4687 (2011).

151. McKinnon, L. R. *et al.* The Evolving Facets of Bacterial Vaginosis: Implications for HIV Transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* **35**, 219–228 (2019).
152. van de Wijkert, J. H. H. M. & Jaspers, V. The global health impact of vaginal dysbiosis. *Res Microbiol* **168**, 859–864 (2017).
153. Petrova, M. I., Reid, G., Vanechoutte, M. & Lebeer, S. Lactobacillus iners: Friend or Foe? *Trends Microbiol* **25**, 182–191 (2017).
154. Amsel, R. *et al.* Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* **74**, 14–22 (1983).
155. Nugent, R. P., Krohn, M. A. & Hillier, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* **29**, 297–301 (1991).
156. Hammes, W. P. & Vogel, R. F. The genus. *The Genera of Lactic Acid Bacteria* 19–54 (1995) doi:10.1007/978-1-4615-5817-0_3.
157. Chee, W. J. Y., Chew, S. Y. & Than, L. T. L. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Fact* **19**, (2020).
158. Srinivasan, S. *et al.* Metabolic signatures of bacterial vaginosis. *mBio* **6**, (2015).
159. Spear, G. T. *et al.* Human α -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by Lactobacillus. *J Infect Dis* **210**, 1019–1028 (2014).
160. Mirmonsef, P. *et al.* Free Glycogen in Vaginal Fluids Is Associated with Lactobacillus Colonization and Low Vaginal pH. *PLoS One* **9**, (2014).
161. Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. S. & Cone, R. A. The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health. *Res Microbiol* **168**, 782–792 (2017).
162. Breshears, L. M., Edwards, V. L., Ravel, J. & Peterson, M. L. Lactobacillus crispatus inhibits growth of Gardnerella vaginalis and Neisseria gonorrhoeae on a porcine vaginal mucosa model. *BMC Microbiol* **15**, (2015).
163. Kovachev, S. Defence factors of vaginal lactobacilli. *Crit Rev Microbiol* **44**, 31–39 (2018).
164. O'Hanlon, D. E., Come, R. A. & Moench, T. R. Vaginal pH measured in vivo: lactobacilli determine pH and lactic acid concentration. *BMC Microbiol* **19**, (2019).
165. O'Hanlon, D. E., Moench, T. R. & Cone, R. A. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect Dis* **11**, (2011).
166. Witkin, S. S. & Linhares, I. M. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG* **124**, 606–611 (2017).
167. Nunn, K. L. *et al.* Enhanced Trapping of HIV-1 by Human Cervicovaginal Mucus Is Associated with Lactobacillus crispatus-Dominant Microbiota. *mBio* **6**, 1–9 (2015).
168. He, Y. *et al.* Evaluation of the Inhibitory Effects of Lactobacillus gasseri and Lactobacillus crispatus on the Adhesion of Seven Common Lower Genital Tract Infection-Causing Pathogens to Vaginal Epithelial Cells. *Front Med (Lausanne)* **7**, 284 (2020).
169. Takada, K. *et al.* Lactobacillus crispatus accelerates re-epithelialization in vaginal epithelial cell line MS74. *Am J Reprod Immunol* **80**, (2018).
170. Manhanzva, M. T. *et al.* Inflammatory and antimicrobial properties differ between vaginal Lactobacillus isolates from South African women with non-optimal versus optimal microbiota. *Scientific Reports* **2020 10:1** **10**, 1–13 (2020).
171. Shiroda, M. & Manning, S. D. Lactobacillus strains vary in their ability to interact with human endometrial stromal cells. *PLoS One* **15**, e0238993 (2020).
172. Castro, J., Jefferson, K. K. & Cerca, N. Genetic Heterogeneity and Taxonomic Diversity among Gardnerella Species. *Trends Microbiol* **28**, 202–211 (2020).
173. Muzny, C. A. *et al.* An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis* **220**, 1399–1405 (2019).

174. Srinivasan, S. *et al.* Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One* **7**, (2012).
175. Swidsinski, A. *et al.* Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. *PLoS One* **8**, (2013).
176. Gelber, S. E., Aguilar, J. L., Lewis, K. L. T. & Ratner, A. J. Functional and phylogenetic characterization of Vaginolysin, the human-specific cytolyisin from *Gardnerella vaginalis*. *J Bacteriol* **190**, 3896–3903 (2008).
177. Cauci, S. *et al.* Correlation of local interleukin-8 with immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and with prolidase and sialidase levels in women with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* **185**, 1614–1620 (2002).
178. Anton, L. *et al.* *Gardnerella vaginalis* alters cervicovaginal epithelial cell function through microbe-specific immune responses. *Microbiome* **10**, 119 (2022).
179. Schwebke, J. R., Muzny, C. A. & Josey, W. E. Role of *Gardnerella vaginalis* in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. *J Infect Dis* **210**, 338–343 (2014).
180. Medina-Colorado, A. A. *et al.* Vaginal ecosystem modeling of growth patterns of anaerobic bacteria in microaerophilic conditions. *Anaerobe* **45**, 10–18 (2017).
181. Moosa, Y., Kwon, D., de Oliveira, T. & Wong, E. B. Determinants of Vaginal Microbiota Composition. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 467 (2020).
182. Lehtoranta, L., Ala-Jaakkola, R., Laitila, A. & Maukonen, J. Healthy Vaginal Microbiota and Influence of Probiotics Across the Female Life Span. *Front Microbiol* **13**, 787 (2022).
183. Song, S. D. *et al.* Daily Vaginal Microbiota Fluctuations Associated with Natural Hormonal Cycle, Contraceptives, Diet, and Exercise. *mSphere* **5**, (2020).
184. Brotman, R. M., Ravel, J., Cone, R. A. & Zenilman, J. M. Rapid fluctuation of the vaginal microbiota measured by Gram stain analysis. *Sex Transm Infect* **86**, 297–302 (2010).
185. Mirmonsef, P. *et al.* Glycogen Levels in Undiluted Genital Fluid and Their Relationship to Vaginal pH, Estrogen, and Progesterone. *PLoS One* **11**, (2016).
186. Nunn, K. L. & Forney, L. J. Focus: Microbiome: Unraveling the Dynamics of the Human Vaginal Microbiome. *Yale J Biol Med* **89**, 331 (2016).
187. Gajer, P. *et al.* Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* **4**, (2012).
188. Carosso, A. *et al.* Controlled ovarian stimulation and progesterone supplementation affect vaginal and endometrial microbiota in IVF cycles: a pilot study. *J Assist Reprod Genet* **37**, 2315–2326 (2020).
189. Cottrell, B. H. An updated review of evidence to discourage douching. *MCN Am J Matern Child Nurs* **35**, 102–107 (2010).
190. Carda-Diéguez, M. *et al.* Variations in Vaginal, Penile, and Oral Microbiota After Sexual Intercourse: A Case Report. *Front Med (Lausanne)* **6**, (2019).
191. Bouvet, J. P., Grésenguet, G. & Bélec, L. Vaginal pH neutralization by semen as a cofactor of HIV transmission. *Clin Microbiol Infect* **3**, 19–23 (1997).
192. Hou, D. *et al.* Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril* **100**, (2013).
193. Ravel, J. *et al.* Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome* **1**, (2013).
194. Brooks, J. P. *et al.* Effects of Combined Oral Contraceptives, Depot Medroxyprogesterone Acetate, and the Levonorgestrel-releasing Intrauterine System on the Vaginal Microbiome. *Contraception* **95**, 405 (2017).
195. Balle, C. *et al.* Hormonal contraception alters vaginal microbiota and cytokines in South African adolescents in a randomized trial. *Nat Commun* **11**, (2020).
196. Yang, L. *et al.* Differential effects of depot medroxyprogesterone acetate administration on vaginal microbiome in Hispanic White and Black women. *Emerg Microbes Infect* **8**, 197

- (2019).
197. Roxby, A. C. *et al.* Changes in vaginal microbiota and immune mediators in HIV-1-seronegative Kenyan women initiating depot medroxyprogesterone acetate. *J Acquir Immune Defic Syndr* **71**, 359 (2016).
 198. Lennard, K. *et al.* Microbial Composition Predicts Genital Tract Inflammation and Persistent Bacterial Vaginosis in South African Adolescent Females. *Infect Immun* **86**, (2017).
 199. Masson, L. *et al.* Inflammatory cytokine biomarkers of asymptomatic sexually transmitted infections and vaginal dysbiosis: a multicentre validation study. *Sex Transm Infect* **95**, 5–12 (2019).
 200. Associations between Vaginal Microbiota and Immune Mediators in the Vaginal Biomarkers Study. <https://virtual.keystonesymposia.org/ks/sessions/1061/view>.
 201. Gautam, R. *et al.* Correlates of the molecular vaginal microbiota composition of African women. *BMC Infect Dis* **15**, 1–14 (2015).
 202. Borgdorff, H. *et al.* Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier. *Mucosal Immunol* **9**, 621–633 (2016).
 203. Hearps, A. C. *et al.* Vaginal lactic acid elicits an anti-inflammatory response from human cervicovaginal epithelial cells and inhibits production of pro-inflammatory mediators associated with HIV acquisition. *Mucosal Immunol* **10**, 1480–1490 (2017).
 204. Eade, C. R. *et al.* Identification and characterization of bacterial vaginosis-associated pathogens using a comprehensive cervical-vaginal epithelial coculture assay. *PLoS One* **7**, (2012).
 205. Doerflinger, S. Y., Throop, A. L. & Herbst-Kralovetz, M. M. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *J Infect Dis* **209**, 1989–1999 (2014).
 206. Anahtar, M. N. *et al.* Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity* **42**, 965–976 (2015).
 207. Baldewijns, S. *et al.* The Role of Fatty Acid Metabolites in Vaginal Health and Disease: Application to Candidiasis. *Front Microbiol* **12**, 1656 (2021).
 208. Amabebe, E. & Anumba, D. O. C. Female Gut and Genital Tract Microbiota-Induced Crosstalk and Differential Effects of Short-Chain Fatty Acids on Immune Sequelae. *Front Immunol* **11**, (2020).
 209. de Jong, S. E., Olin, A. & Pulendran, B. The Impact of the Microbiome on Immunity to Vaccination in Humans. *Cell Host Microbe* **28**, 169–179 (2020).
 210. Grassly, N. C. *et al.* The effect of azithromycin on the immunogenicity of oral poliovirus vaccine: a double-blind randomised placebo-controlled trial in seronegative Indian infants. *Lancet Infect Dis* **16**, 905–914 (2016).
 211. Jang, S. E. *et al.* Lactobacillus rhamnosus HN001 and Lactobacillus acidophilus La-14 Attenuate Gardnerella vaginalis-Infected Bacterial Vaginosis in Mice. *Nutrients* **9**, (2017).
 212. Lev-Sagie, A. *et al.* Vaginal microbiome transplantation in women with intractable bacterial vaginosis. *Nat Med* **25**, 1500–1504 (2019).
 213. Adapen, C. *et al.* Local Innate Markers and Vaginal Microbiota Composition Are Influenced by Hormonal Cycle Phases. *Front Immunol* **13**, 1164 (2022).
 214. Zhang, D. & Frenette, P. S. Cross talk between neutrophils and the microbiota. *Blood* **133**, 2168 (2019).
 215. Deshmukh, H. S. *et al.* The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med* **20**, 524–530 (2014).
 216. Mtshali, A. *et al.* Temporal Changes in Vaginal Microbiota and Genital Tract Cytokines Among South African Women Treated for Bacterial Vaginosis. *Front Immunol* **12**, (2021).
 217. Fagundes, C. T. *et al.* Transient TLR activation restores inflammatory response and ability

- to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J Immunol* **188**, 1411–1420 (2012).
218. Zhang, D. *et al.* Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* **525**, 528–532 (2015).
219. Wang, Y. *et al.* Lactobacillus acidophilus and Clostridium butyricum ameliorate colitis in murine by strengthening the gut barrier function and decreasing inflammatory factors. *Benef Microbes* **9**, 775–787 (2018).
220. Vinolo, M. A. R. *et al.* Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clin Sci (Lond)* **117**, 331–338 (2009).
221. Ohkubo, T., Tsuda, M., Tamura, M. & Yamamura, M. Impaired superoxide production in peripheral blood neutrophils of germ-free rats. *Scand J Immunol* **32**, 727–729 (1990).
222. Clarke, T. B. *et al.* Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nature Medicine* **16**, 228–231 (2010).
223. Li, G. *et al.* Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* **13**, (2021).
224. Vinolo, M. A. R. *et al.* Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem* **22**, 849–855 (2011).
225. Hu, X. *et al.* Gut microbiota mediate the protective effects on endometritis induced by Staphylococcus aureus in mice. *Food Funct* **11**, 3695–3705 (2020).
226. Mohammadi, A. *et al.* The impact of cervical cytobrush sampling on cervico-vaginal immune parameters and microbiota relevant to HIV susceptibility. *Scientific Reports* **10**, 1–10 (2020).
227. Cauci, S. *et al.* Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Mol Hum Reprod* **9**, 53–58 (2003).
228. Chen, Q. *et al.* The Protective Effects of Lactobacillus plantarum KLDS 1.0344 on LPS-Induced Mastitis In Vitro and In Vivo. *Front Immunol* **12**, (2021).
229. Michels, M. *et al.* Immunomodulatory Effect of Bifidobacterium, Lactobacillus, and Streptococcus Strains of Paraprobiotics in Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammatory Responses in RAW-264.7 Macrophages. *Curr Microbiol* **79**, (2021).
230. Molloy, M. J. *et al.* Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis. *Cell Host Microbe* **14**, 318–328 (2013).
231. Yoshimura, T. *et al.* The Antimicrobial Peptide CRAMP Is Essential for Colon Homeostasis by Maintaining Microbiota Balance. *J Immunol* **200**, 2174–2185 (2018).
232. Winterbourn, C. C., Kettle, A. J. & Hampton, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem* **85**, 765–792 (2016).
233. Hahn, S., Giaglis, S., Chowdury, C. S., Hösli, I. & Hasler, P. Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology. *Semin Immunopathol* **35**, 439–453 (2013).
234. Bornhöfft, K. F. *et al.* Sialylated Cervical Mucins Inhibit the Activation of Neutrophils to Form Neutrophil Extracellular Traps in Bovine in vitro Model. *Front Immunol* **10**, (2019).
235. Pothuraju, R. *et al.* Mucins, gut microbiota, and postbiotics role in colorectal cancer. *Gut Microbes* **13**, (2021).
236. Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A., Calvete, J. J., Peña Vega, F. J. & Roca, J. Seminal Plasma: Relevant for Fertility? *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
237. Anderson, D. J. & Politch, J. A. Role of Seminal Plasma in Human Female Reproductive Failure: Immunomodulation, Inflammation, and Infections. *Adv Exp Med Biol* **868**, 159–169 (2015).
238. Rolland, A. D. *et al.* Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Hum Reprod* **28**, 199–209 (2013).

239. Sheu, G., Revenig, L. M. & Hsiao, W. Physiology of Ejaculation. *Men's Sexual Health and Fertility* 13–29 (2014) doi:10.1007/978-1-4939-0425-9_2.
240. Owen, D. H. & Katz, D. F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl* **26**, 459–469 (2005).
241. Mateo-Otero, Y. *et al.* 1 H Nuclear Magnetic Resonance of Pig Seminal Plasma Reveals Intra-Ejaculate Variation in Metabolites. *Biomolecules* **10**, 1–16 (2020).
242. Kelly, R. W. Prostaglandins in primate semen: biasing the immune system to benefit spermatozoa and virus? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **57**, 113–118 (1997).
243. Drabovich, A. P., Saraon, P., Jarvi, K. & Diamandis, E. P. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nature Reviews Urology* 2014 11:5 **11**, 278–288 (2014).
244. Juyena, N. S. & Stelletta, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl* **33**, 536–551 (2012).
245. Druart, X., Rickard, J. P., Tsikis, G. & de Graaf, S. P. Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology* **137**, 30–35 (2019).
246. Candenas, L. & Chianese, R. Exosome Composition and Seminal Plasma Proteome: A Promising Source of Biomarkers of Male Infertility. *Int J Mol Sci* **21**, 1–27 (2020).
247. Samanta, L., Parida, R., Dias, T. R. & Agarwal, A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol* **16**, (2018).
248. de Lamirande, E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost* **33**, 60–68 (2007).
249. Grande, G., Milardi, D., Baroni, S., Luca, G. & Pontecorvi, A. Identification of seminal markers of male accessory gland inflammation: From molecules to proteome. *Am J Reprod Immunol* **80**, (2018).
250. Wigby, S., Suarez, S. S., Lazzaro, B. P., Pizzari, T. & Wolfner, M. F. Sperm success and immunity. *Curr Top Dev Biol* **135**, 287–313 (2019).
251. Robertson, S. A., Mau, V. J., Hudson, S. N. & Tremellen, K. P. Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **37**, 438–442 (1997).
252. Morgan, H. L. & Watkins, A. J. The influence of seminal plasma on offspring development and health. *Semin Cell Dev Biol* **97**, 131–137 (2020).
253. Gilany, K., Minai-Tehrani, A., Savadi-Shiraz, E., Rezadoost, H. & Lakpour, N. Exploring the Human Seminal Plasma Proteome: An Unexplored Gold Mine of Biomarker for Male Infertility and Male Reproduction Disorder. *J Reprod Infertil* **16**, 61 (2015).
254. MANDAL, A. & BHATTACHARYYA, A. K. Differences in osmolality, pH, buffering capacity, superoxide dismutase and maintenance of sperm motility in human ejaculates according to the degree of coagulation. *Int J Androl* **11**, 45–51 (1988).
255. Schjenken, J. E. & Robertson, S. A. The female response to seminal fluid. *Physiol Rev* **100**, 1077–1117 (2020).
256. Bracke, A., Peeters, K., Punjabi, U., Hoogewijs, D. & Dewilde, S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online* **36**, 327–339 (2018).
257. Cariati, F., D'Argenio, V. & Tomaiuolo, R. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. *Journal of Translational Medicine* 2019 17:1 **17**, 1–33 (2019).
258. Drabovich, A. P., Jarvi, K. & Diamandis, E. P. Verification of male infertility biomarkers in seminal plasma by multiplex selected reaction monitoring assay. *Mol Cell Proteomics* **10**, (2011).
259. Vashisht, A., Ahluwalia, P. K. & Gahlay, G. K. A Comparative Analysis of the Altered Levels of Human Seminal Plasma Constituents as Contributing Factors in Different Types of Male Infertility. *Curr Issues Mol Biol* **43**, 1307–1324 (2021).
260. Dissanayake, D. M. I. H., Keerthirathna, W. L. R. & Peiris, L. D. C. Male Infertility Problem: A

- Contemporary Review on Present Status and Future Perspective. *Gend Genome* **3**, 247028971986824 (2019).
261. Wang, L. *et al.* Effects of PM 2.5 exposure on reproductive system and its mechanisms. *Chemosphere* **264**, (2021).
262. Zhang, J., Cai, Z., Ma, C., Xiong, J. & Li, H. Impacts of Outdoor Air Pollution on Human Semen Quality: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Biomed Res Int* **2020**, (2020).
263. Watkins, A. J. *et al.* Paternal diet programs offspring health through sperm- and seminal plasma-specific pathways in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 10064–10069 (2018).
264. Reyes, J. G. *et al.* The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, (2012).
265. Rao, M. *et al.* Transient scrotal hyperthermia affects human sperm DNA integrity, sperm apoptosis, and sperm protein expression. *Andrology* **4**, 1054–1063 (2016).
266. Azenabor, A., Ekun, A. O. & Akinloye, O. Impact of Inflammation on Male Reproductive Tract. *J Reprod Infertil* **16**, 123 (2015).
267. Hales, D. B., Diemer, T. & Held Hales, K. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* **10**, 201–217 (1999).
268. Sharkey, D. J., Tremellen, K. P., Briggs, N. E., Dekker, G. A. & Robertson, S. A. Seminal plasma transforming growth factor- β , activin A and follistatin fluctuate within men over time. *Hum Reprod* **31**, 2183–2191 (2016).
269. Sharkey, D. J., Tremellen, K. P., Briggs, N. E., Dekker, G. A. & Robertson, S. A. Seminal plasma pro-inflammatory cytokines interferon- γ (IFNG) and C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8) fluctuate over time within men. *Human Reproduction* **32**, 1373–1381 (2017).
270. Tomaiuolo, R., Veneruso, I., Cariati, F. & D'argenio, V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Male Infertility. *High Throughput* **9**, (2020).
271. Robertson, S. A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci* **85**, (2007).
272. Introini, A. *et al.* Seminal plasma induces inflammation and enhances HIV-1 replication in human cervical tissue explants. *PLoS Pathog* **13**, (2017).
273. Mohammadi, A. *et al.* Immune parameters of HIV susceptibility in the female genital tract before and after penile-vaginal sex. *Communications Medicine* **2022 2:1** **2**, 1–15 (2022).
274. Jewanraj, J. *et al.* Transient association between semen exposure and biomarkers of genital inflammation in South African women at risk of HIV infection. *J Int AIDS Soc* **24**, (2021).
275. Katila, T. Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod Domest Anim* **47 Suppl 5**, 31–41 (2012).
276. Bai, R. *et al.* Induction of immune-related gene expression by seminal exosomes in the porcine endometrium. *Biochem Biophys Res Commun* **495**, 1094–1101 (2018).
277. Glynn, D. J. *et al.* Male seminal relaxin contributes to induction of the post-mating cytokine response in the female mouse uterus. *Front Physiol* **8**, 422 (2017).
278. Schjenken, J. E., Glynn, D. J., Sharkey, D. J. & Robertson, S. A. TLR4 Signaling Is a Major Mediator of the Female Tract Response to Seminal Fluid in Mice. *Biol Reprod* **93**, (2015).
279. Robertson, S. A., Mau, V. J., Tremellen, K. P. & Seamark, R. F. Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice. *J Reprod Fertil* **107**, 265–277 (1996).
280. Song, Z. H. *et al.* Seminal plasma induces inflammation in the uterus through the $\gamma\delta$ T/IL-17 pathway. *Scientific Reports* **2016 6:1** **6**, 1–8 (2016).
281. Robertson, S. A., Ingman, W. v., O'Leary, S., Sharkey, D. J. & Tremellen, K. P. Transforming growth factor β —a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol* **57**, 109–128 (2002).
282. Rametse, C. L. *et al.* 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 (2014).
283. Adefuye, A., Katz, A. A. & Sales, K. J. The regulation of inflammatory pathways and infectious disease of the cervix by seminal fluid. *Patholog Res Int* **2014**, (2014).
 284. Kalinski, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* **188**, 21–28 (2012).
 285. Rodriguez-Martinez, H. *et al.* Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. *J Reprod Immunol* **84**, 57–65 (2010).
 286. Alghamdi, A. S. & Foster, D. N. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod* **73**, 1174–1181 (2005).
 287. Alghamdi, A. S., Foster, D. N. & Troedsson, M. H. T. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction* **127**, 593–600 (2004).
 288. Doty, A. *et al.* Equine CRISP3 Modulates Interaction Between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils. *Biol Reprod* **85**, 157–164 (2011).
 289. Aloé, S., Weber, F., Behr, B., Sauter-Louis, C. & Zerbe, H. Modulatory effects of bovine seminal plasma on uterine inflammatory processes. *Reprod Domest Anim* **47**, 12–19 (2012).
 290. Gilbert, R. O. & Fales, M. H. The effect of bovine seminal plasma on the function and integrity of bovine neutrophils. *Theriogenology* **46**, 649–658 (1996).
 291. Troedsson, M. H. T., Loset, K., Alghamdi, A. M., Dahms, B. & Crabo, B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci* **68**, 273–278 (2001).
 292. Chow, P. H., Jiang, H. Y., Poon, H. K., Lee, K. H. & O, W. S. Embryos sired by males without accessory sex glands induce failure of uterine support: a study of VEGF, MMP and TGF expression in the golden hamster. *Anat Embryol (Berl)* **206**, 203–213 (2003).
 293. Remes Lenicov, F. *et al.* Semen promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* **189**, 4777–4786 (2012).
 294. Bromfield, J. J. Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. *J Assist Reprod Genet* **31**, 627–636 (2014).
 295. Meuleman, T. *et al.* The immunomodulating effect of seminal plasma on T cells. *J Reprod Immunol* **110**, 109–116 (2015).
 296. Rubtsov, Y. P. & Rudensky, A. Y. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* **7**, 443–453 (2007).
 297. Robertson, S. A., Guerin, L. R., Moldenhauer, L. M. & Hayball, J. D. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. *J Reprod Immunol* **83**, 109–116 (2009).
 298. Kapovic, M. & Rukavina, D. Kinetics of lymphoproliferative responses of lymphocytes harvested from the uterine draining lymph nodes during pregnancy in rats. *J Reprod Immunol* **20**, 93–101 (1991).
 299. Robertson, S. A., Care, A. S. & Moldenhauer, L. M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J Clin Invest* **128**, 4224 (2018).
 300. Varese, A. *et al.* Seminal vesicle fluid increases the efficacy of intravaginal HSV-2 vaccination. *Mucosal Immunol* **11**, 536–548 (2018).
 301. Marlin, R. *et al.* Seminal plasma exposures strengthen vaccine responses in the female reproductive tract mucosae. *Front Immunol* **10**, 430 (2019).
 302. Paiva, A. & Casseb, J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop* **47**, 265–274 (2014).
 303. Herpes simplex virus- Fact sheet, WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>.
 304. le Tortorec, A. *et al.* From ancient to emerging infections: The odyssey of viruses in the

- male genital tract. *Physiol Rev* **100**, 1349–1414 (2020).
305. Tachet, A. *et al.* Detection and quantification of HIV-1 in semen: identification of a subpopulation of men at high potential risk of viral sexual transmission. *AIDS* **13**, 823–831 (1999).
306. Osborne, B. J. W. *et al.* Clinical and Mucosal Immune Correlates of HIV-1 Semen Levels in Antiretroviral-Naive Men. *Open Forum Infect Dis* **4**, (2017).
307. Liu, C. M. *et al.* The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. *PLoS Pathog* **10**, (2014).
308. Balandya, E., Sheth, S., Sanders, K., Wieland-Alter, W. & Lahey, T. Semen Protects CD4+ Target Cells from HIV Infection but Promotes the Preferential Transmission of R5 Tropic HIV. *J Immunol* **185**, 7596 (2010).
309. Sabatte, J. *et al.* Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. *J Immunol* **187**, 5299–5309 (2011).
310. Söderlund, J., Hirbod, T., Goh, L. E., Andersson, J. & Broliden, K. Presence of HIV-1 neutralizing IgA antibodies in primary HIV-1 infected patients. *Scand J Infect Dis* **36**, 663–669 (2004).
311. Bouhlal, H. *et al.* Opsonization of HIV-1 by semen complement enhances infection of human epithelial cells. *J Immunol* **169**, 3301–3306 (2002).
312. de Saint Jean, A., Lucht, F., Bourlet, T. & Delézay, O. Transforming growth factor beta 1 up-regulates CD169 (sialoadhesin) expression on monocyte-derived dendritic cells: role in HIV sexual transmission. *AIDS* **28**, 2375–2380 (2014).
313. Allen, S. A. *et al.* Characterization of the Influence of Semen-Derived Enhancer of Virus Infection on the Interaction of HIV-1 with Female Reproductive Tract Tissues. *J Virol* **89**, 5569–5580 (2015).
314. Olivier, A. J. *et al.* Distinct Cytokine Patterns in Semen Influence Local HIV Shedding and HIV Target Cell Activation. *J Infect Dis* **209**, 1174 (2014).
315. Camus, C. *et al.* Comparison of the effect of semen from HIV-infected and uninfected men on CD4+ T-cell infection. *AIDS* **30**, 1197–1208 (2016).
316. Savasi, V. *et al.* Effects of highly active antiretroviral therapy on semen parameters of a cohort of 770 HIV-1 infected men. *PLoS One* **14**, e0212194 (2019).
317. le Tortorec, A. & Dejuq-Rainsford, N. HIV infection of the male genital tract – consequences for sexual transmission and reproduction. *Int J Androl* **33**, e98 (2010).
318. Sharkey, D. J., Glynn, D. J., Schjenken, J. E., Tremellen, K. P. & Robertson, S. A. Interferon-gamma inhibits seminal plasma induction of colony-stimulating factor 2 in mouse and human reproductive tract epithelial cells. *Biol Reprod* **99**, 514–526 (2018).
319. Newman, L. *et al.* Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS One* **10**, (2015).
320. Chlamydia infection. <https://www.ecdc.europa.eu/en/chlamydia-infection>.
321. Walker, J. *et al.* Chlamydia trachomatis incidence and re-infection among young women--behavioural and microbiological characteristics. *PLoS One* **7**, (2012).
322. Bulletin de santé publique VIH-IST. Décembre 2021. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-sexuellement-transmissibles/vih-sida/documents/bulletin-national/bulletin-de-sante-publique-vih-ist.-decembre-2021>.
323. *Santé publique France, réseau Rénachla, 2000-2017*. <https://www.santepubliquefrance.fr/>.
324. Elwell, C., Mirrashidi, K. & Engel, J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **14**, 385–400 (2016).
325. Murthy, A. K., Li, W. & Ramsey, K. H. Immunopathogenesis of Chlamydial Infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **412**, 183–215 (2018).

326. di Pietro, M., Filardo, S., Romano, S. & Sessa, R. Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae Interaction with the Host: Latest Advances and Future Prospective. *Microorganisms* **7**, (2019).
327. Hybiske, K. & Stephens, R. S. Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells. *Infect Immun* **75**, 3925–3934 (2007).
328. Nans, A., Ford, C. & Hayward, R. D. Host-pathogen reorganisation during host cell entry by Chlamydia trachomatis. *Microbes Infect* **17**, 727–731 (2015).
329. Cocchiaro, J. L. & Valdivia, R. H. New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. *Cell Microbiol* **11**, 1571 (2009).
330. Tan, M. & Bavoil, P. M. Intracellular pathogens I: Chlamydiales. 388.
331. Wyrick, P. B. Chlamydia trachomatis Persistence in Vitro – An Overview. *J Infect Dis* **201**, S88 (2010).
332. Belland, R. J. *et al.* Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN- γ -mediated persistence and reactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15971 (2003).
333. Darville, T. & Hiltke, T. J. Pathogenesis of Genital Tract Disease due to Chlamydia trachomatis. *J Infect Dis* **201**, S114 (2010).
334. Bébéar, C. & de Barbeyrac, B. Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect* **15**, 4–10 (2009).
335. Poston, T. B. & Darville, T. First genital chlamydia vaccine enters in-human clinical trial. *Lancet Infect Dis* **19**, 1039–1040 (2019).
336. de La Maza, L. M., Zhong, G. & Brunham, R. C. Update on Chlamydia trachomatis Vaccinology. *Clin Vaccine Immunol* **24**, (2017).
337. Low, N. *et al.* Epidemiological, social, diagnostic and economic evaluation of population screening for genital chlamydial infection. *Health Technol Assess* **11**, (2007).
338. Skinner, M. C., Stamm, W. E. & Lampe, M. L. Chlamydia trachomatis Laboratory Strains versus Recent Clinical Isolates: Implications for Routine Microbicide Testing. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1482 (2009).
339. Hammerschlag, M. R. & Sharma, R. Azithromycin in the treatment of rectogenital Chlamydia trachomatis infections: end of an era? *Expert Rev Anti Infect Ther* **19**, 487–493 (2021).
340. Kong, F. Y. S. *et al.* The efficacy of azithromycin and doxycycline for the treatment of rectal chlamydia infection: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* **70**, 1290–1297 (2015).
341. Quayle, A. J. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* **57**, 61–79 (2002).
342. Chen, H., Wen, Y. & Li, Z. Clear victory for chlamydia: The subversion of host innate immunity. *Front Microbiol* **10**, 1412 (2019).
343. Buchholz, K. R. & Stephens, R. S. The cytosolic pattern recognition receptor NOD1 induces inflammatory interleukin-8 during Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun* **76**, 3150–3155 (2008).
344. Matsuo, J. *et al.* Activation of caspase-3 during chlamydia trachomatis-induced apoptosis at a late stage. *Can J Microbiol* **65**, 135–143 (2019).
345. Mackern-Oberti, J. P. *et al.* Chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: An update. *J Reprod Immunol* **100**, 37–53 (2013).
346. Johnson, R. M. Murine oviduct epithelial cell cytokine responses to Chlamydia muridarum infection include interleukin-12-p70 secretion. *Infect Immun* **72**, 3951–3960 (2004).
347. Maxion, H. K. & Kelly, K. A. Chemokine expression patterns differ within anatomically distinct regions of the genital tract during Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun* **70**, 1538–1546 (2002).
348. Devitt, A., Lund, P. A., Morris, A. G. & Pearce, J. H. Induction of alpha/beta interferon and

- dependent nitric oxide synthesis during *Chlamydia trachomatis* infection of McCoy cells in the absence of exogenous cytokine. *Infect Immun* **64**, 3951–3956 (1996).
349. Buckner, L. R., Lewis, M. E., Greene, S. J., Foster, T. P. & Quayle, A. J. *Chlamydia trachomatis* infection results in a modest pro-inflammatory cytokine response and a decrease in T cell chemokine secretion in human polarized endocervical epithelial cells. *Cytokine* **63**, 151–165 (2013).
350. Rasmussen, S. J. *et al.* Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation* **99**, 77 (1997).
351. Darville, T. *et al.* Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. *J Immunol* **171**, 6187–6197 (2003).
352. Brunham, R. C. & Rey-Ladino, J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nat Rev Immunol* **5**, 149–161 (2005).
353. Lu, H., Shen, C. & Brunham, R. C. *Chlamydia trachomatis* infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18. *J Immunol* **165**, 1463–1469 (2000).
354. Xu, J. Z. *et al.* Toll-Like Receptor 3 Deficiency Leads to Altered Immune Responses to *Chlamydia trachomatis* Infection in Human Oviduct Epithelial Cells. *Infect Immun* **87**, (2019).
355. Agrawal, T., Vats, V., Salhan, S. & Mittal, A. The mucosal immune response to *Chlamydia trachomatis* infection of the reproductive tract in women. *J Reprod Immunol* **83**, 173–178 (2009).
356. Spear, G. T. *et al.* Multiplex immunoassay of lower genital tract mucosal fluid from women attending an urban STD clinic shows broadly increased IL1 β and lactoferrin. *PLoS One* **6**, (2011).
357. Poston, T. B. *et al.* Cervical Cytokines Associated With *Chlamydia trachomatis* Susceptibility and Protection. *J Infect Dis* **220**, 330–339 (2019).
358. Agrawal, T. *et al.* Recruitment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in cervical mucosa during *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Microbiol Infect* **15**, 50–59 (2009).
359. Arno, J. N. *et al.* Interferon-gamma in endocervical secretions of women infected with *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis* **162**, 1385–1389 (1990).
360. Radomski, N. *et al.* *Chlamydia psittaci*-Infected Dendritic Cells Communicate with NK Cells via Exosomes To Activate Antibacterial Immunity. *Infect Immun* **88**, (2019).
361. Perry, L. L., Feilzer, K. & Caldwell, H. D. Immunity to *Chlamydia trachomatis* is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *The Journal of Immunology* **158**, (1997).
362. Shemer-Avni, Y., Wallach, D. & Sarov, I. Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth by recombinant tumor necrosis factor. *Infect Immun* **56**, 2503–2506 (1988).
363. Mercado, M. A. B., Du, W., Malaviarachchi, P. A., Gann, J. I. & Li, L. X. Innate IFN- γ Is Essential for Systemic *Chlamydia muridarum* Control in Mice, While CD4 T Cell-Dependent IFN- γ Production Is Highly Redundant in the Female Reproductive Tract. *Infect Immun* **89**, (2021).
364. Hvid, M. *et al.* Interleukin-1 is the initiator of Fallopian tube destruction during *Chlamydia trachomatis* infection. *Cell Microbiol* **9**, 2795–2803 (2007).
365. Gyorke, C. E. *et al.* IL-1 α Is Essential for Oviduct Pathology during Genital Chlamydial Infection in Mice. *J Immunol* **205**, 3037–3049 (2020).
366. Lehr, S., Vier, J., Häcker, G. & Kirschnek, S. Activation of neutrophils by *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is modulated by the chlamydial plasmid. *Microbes Infect* **20**, 284–292 (2018).
367. Lijek, R. S., Helble, J. D., Olive, A. J., Seiger, K. W. & Starnbach, M. N. Pathology after *Chlamydia trachomatis* infection is driven by nonprotective immune cells that are distinct from protective populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 2216–2221 (2018).

368. Lee, H. Y. *et al.* A role for CXC chemokine receptor-2 in the pathogenesis of urogenital *Chlamydia muridarum* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **60**, 49–56 (2010).
369. Imtiaz, M. T. *et al.* A role for matrix metalloproteinase-9 in pathogenesis of urogenital *Chlamydia muridarum* infection in mice. *Microbes Infect* **9**, 1561–1566 (2007).
370. Dai, J. *et al.* The p47phox deficiency significantly attenuates the pathogenicity of *Chlamydia muridarum* in the mouse oviduct but not uterine tissues. *Microbes Infect* **18**, 190–198 (2016).
371. Yang, C. *et al.* *Chlamydia trachomatis* plasmid gene protein 3 is essential for the establishment of persistent infection and associated immunopathology. *mBio* **11**, 1–12 (2020).
372. Rajeeve, K., Das, S., Prusty, B. K. & Rudel, T. *Chlamydia trachomatis* paralyses neutrophils to evade the host innate immune response. *Nat Microbiol* **3**, 824–835 (2018).
373. Dudiak, B. M. *et al.* Insights into the Autoproteolytic Processing and Catalytic Mechanism of the *Chlamydia trachomatis* Virulence-Associated Protease CPAF. *Biochemistry* **58**, 3527–3536 (2019).
374. Naglak, E. K., Morrison, S. G. & Morrison, R. P. Neutrophils Are Central to Antibody-Mediated Protection against Genital *Chlamydia*. *Infect Immun* **85**, (2017).
375. Zhang, D., Yang, X., Lu, H., Zhong, G. & Brunham, R. C. Immunity to *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis induced by vaccination with live organisms correlates with early granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-12 production and with dendritic cell-like maturation. *Infect Immun* **67**, 1606–1613 (1999).
376. Datta, B., Njau, F., Thalmann, J., Haller, H. & Wagner, A. D. Differential infection outcome of *Chlamydia trachomatis* in human blood monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *BMC Microbiol* **14**, 1–14 (2014).
377. Lausen, M., Christiansen, G., Bouet Guldbæk Poulsen, T. & Birkelund, S. Immunobiology of monocytes and macrophages during *Chlamydia trachomatis* infection. *Microbes Infect* **21**, 73–84 (2019).
378. Neutra, M. R., Pringault, E. & Kraehenbuhl, J. P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* **14**, 275–300 (1996).
379. Hafner, L. M., Cunningham, K. & Beagley, K. W. Ovarian steroid hormones: effects on immune responses and *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract. *Mucosal Immunology* 2013 6:5 **6**, 859–875 (2013).
380. Agrawal, T., Bhengraj, A. R., Vats, V. & Mittal, A. *Chlamydia trachomatis*: TLR4-mediated recognition by human dendritic cells is impaired following oestradiol treatment. *Br J Biomed Sci* **70**, 51–57 (2013).
381. Wang, H. *et al.* NK Cells Contribute to Protective Memory T Cell Mediated Immunity to *Chlamydia muridarum* Infection. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 296 (2020).
382. Tominaga, K. *et al.* IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol* **12**, 151–160 (2000).
383. Østergaard, O. *et al.* Quantitative Protein Profiling of *Chlamydia trachomatis* Growth Forms Reveals Defense Strategies Against Tryptophan Starvation. *Mol Cell Proteomics* **15**, 3540 (2016).
384. Ziklo, N., Huston, W. M., Taing, K., Katouli, M. & Timms, P. In vitro rescue of genital strains of *Chlamydia trachomatis* from interferon- γ and tryptophan depletion with indole-positive, but not indole-negative *Prevotella* spp. *BMC Microbiol* **16**, 1–10 (2016).
385. Moore-Connors, J. M., Fraser, R., Halperin, S. A. & Wang, J. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells promote Th17 responses and genital tract inflammation upon intracellular *Chlamydia muridarum* infection. *J Immunol* **191**, 3430–3439 (2013).
386. Lu, C. *et al.* Protective immunity against mouse upper genital tract pathology correlates with high IFN γ but low IL-17 T cell and anti-secretion protein antibody responses induced

- by replicating chlamydial organisms in the airway. *Vaccine* **30**, 475–485 (2012).
387. Bagri, P., Anipindi, V. C. & Kaushic, C. The Role of IL-17 During Infections in the Female Reproductive Tract. *Front Immunol* **13**, (2022).
388. O'Meara, C. P. *et al.* Immunity against a Chlamydia infection and disease may be determined by a balance of IL-17 signaling. *Immunol Cell Biol* **92**, 287–297 (2014).
389. Farris, C. M., Morrison, S. G. & Morrison, R. P. CD4+ T cells and antibody are required for optimal major outer membrane protein vaccine-induced immunity to Chlamydia muridarum genital infection. *Infect Immun* **78**, 4374–4383 (2010).
390. Olsen, A. W., Lorenzen, E. K., Rosenkrands, I., Follmann, F. & Andersen, P. Protective effect of vaccine promoted neutralizing antibodies against the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis. *Front Immunol* **8**, 11 (2017).
391. Öhman, H., Rantsi, T., Joki-Korpela, P., Tiitinen, A. & Surcel, H. M. Prevalence and persistence of Chlamydia trachomatis-specific antibodies after occasional and recurrent infections. *Sex Transm Infect* **96**, 277–282 (2020).
392. Agrawal, T., Vats, V., Salhan, S. & Mittal, A. Mucosal and peripheral immune responses to chlamydial heat shock proteins in women infected with Chlamydia trachomatis. *Clin Exp Immunol* **148**, 461 (2007).
393. Cohen, C. R. *et al.* Immunoepidemiologic profile of Chlamydia trachomatis infection: importance of heat-shock protein 60 and interferon- gamma. *J Infect Dis* **192**, 591–599 (2005).
394. Russell, A. N. *et al.* Analysis of Factors Driving Incident and Ascending Infection and the Role of Serum Antibody in Chlamydia trachomatis Genital Tract Infection. *J Infect Dis* **213**, 523–531 (2016).
395. el Hakim, E. A., Gordon, U. D. & Akande, V. A. The relationship between serum Chlamydia antibody levels and severity of disease in infertile women with tubal damage. *Arch Gynecol Obstet* **281**, 727–733 (2010).
396. Kimani, J. *et al.* Risk factors for Chlamydia trachomatis pelvic inflammatory disease among sex workers in Nairobi, Kenya. *J Infect Dis* **173**, 1437–1444 (1996).
397. Filardo, S. *et al.* Selected Immunological Mediators and Cervical Microbial Signatures in Women with Chlamydia trachomatis Infection. *mSystems* **4**, (2019).
398. Filardo, S. *et al.* Diversity of Cervical Microbiota in Asymptomatic Chlamydia trachomatis Genital Infection: A Pilot Study. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 321 (2017).
399. Tamarelle, J. *et al.* The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and Mycoplasma genitalium infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* **25**, 35–47 (2019).
400. van de Wijgert, J. H. H. M. The vaginal microbiome and sexually transmitted infections are interlinked: Consequences for treatment and prevention. *PLoS Med* **14**, (2017).
401. Martin, D. H. The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease. *Am J Med Sci* **343**, 2 (2012).
402. Ziklo, N., Huston, W. M., Hocking, J. S. & Timms, P. Chlamydia trachomatis Genital Tract Infections: When Host Immune Response and the Microbiome Collide. *Trends Microbiol* **24**, 750–765 (2016).
403. Edwards, V. L. *et al.* The cervicovaginal microbiota-host interaction modulates chlamydia trachomatis infection. *mBio* **10**, (2019).
404. Molenaar, M. C., Singer, M. & Ouburg, S. The two-sided role of the vaginal microbiome in Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium pathogenesis. *J Reprod Immunol* **130**, 11–17 (2018).
405. Chen, H. *et al.* Lactobacillus Modulates Chlamydia Infectivity and Genital Tract Pathology in vitro and in vivo. *Front Microbiol* **13**, (2022).
406. Nardini, P. *et al.* Lactobacillus crispatus inhibits the infectivity of Chlamydia trachomatis

- elementary bodies, in vitro study. *Sci Rep* **6**, (2016).
407. Gong, Z., Luna, Y., Yu, P. & Fan, H. Lactobacilli inactivate Chlamydia trachomatis through lactic acid but not H₂O₂. *PLoS One* **9**, (2014).
408. Borgdorff, H. *et al.* Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women. *ISME J* **8**, 1781–1793 (2014).
409. ñahui Palomino, R. A., Zicari, S., Vanpouille, C., Vitali, B. & Margolis, L. Vaginal Lactobacillus Inhibits HIV-1 Replication in Human Tissues Ex Vivo. *Front Microbiol* **8**, (2017).
410. Mastromarino, P. *et al.* Effects of vaginal lactobacilli in Chlamydia trachomatis infection. *Int J Med Microbiol* **304**, 654–661 (2014).
411. Parolin, C. *et al.* Lactobacillus crispatus BC5 interferes with Chlamydia trachomatis infectivity through integrin modulation in cervical cells. *Front Microbiol* **9**, (2018).
412. Masson, L. *et al.* Genital Inflammation and the Risk of HIV Acquisition in Women. *Clin Infect Dis* **61**, 260 (2015).
413. Probiotics: Potential to Prevent HIV and Sexually Transmitted Infections in Women on JSTOR. <https://www.jstor.org/stable/44971439>.
414. Ziklo, N., Vidgen, M. E., Taing, K., Huston, W. M. & Timms, P. Dysbiosis of the Vaginal Microbiota and Higher Vaginal Kynurenine/Tryptophan Ratio Reveals an Association with Chlamydia trachomatis Genital Infections. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, (2018).
415. Tamarelle, J. *et al.* Nonoptimal Vaginal Microbiota After Azithromycin Treatment for Chlamydia trachomatis Infection. *J Infect Dis* **221**, 627–635 (2020).
416. Zhao, L., Lundy, S. R., Eko, F. O., Igietseme, J. U. & Omosun, Y. O. Genital tract microbiome dynamics are associated with time of Chlamydia infection. *bioRxiv* 2022.07.18.500533 (2022) doi:10.1101/2022.07.18.500533.
417. Hanna, L., Keshishyan, H., Brooks, G. F., Stites, D. P. & Jawetz, E. Effect of seminal plasma on Chlamydia trachomatis strain LB-1 in cell culture. *Infect Immun* **32**, 404–406 (1981).
418. Johnson, L. F. & Lewis, D. A. The effect of genital tract infections on HIV-1 shedding in the genital tract: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Dis* **35**, 946–959 (2008).
419. Atashili, J., Poole, C., Ndumbe, P. M., Adimora, A. A. & Smith, J. S. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS* **22**, 1493–1501 (2008).
420. HIV. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
421. AIDSinfo | UNAIDS. <https://aidsinfo.unaids.org/>.
422. Mafokwane, T. M. & Samie, A. Prevalence of chlamydia among HIV positive and HIV negative patients in the Vhembe District as detected by real time PCR from urine samples Microbiology. *BMC Res Notes* **9**, 1–10 (2016).
423. Rodrigues, L. L. S. *et al.* Sexually transmitted infections among HIV-infected and HIV-uninfected women in the Tapajós region, Amazon, Brazil: Self-collected vs. clinician-collected samples. *PLoS One* **14**, (2019).
424. Peterman, T. A., Newman, D. R., Maddox, L., Schmitt, K. & Shiver, S. Risk for HIV following a diagnosis of syphilis, gonorrhoea or chlamydia: 328,456 women in Florida, 2000-2011. *Int J STD AIDS* **26**, 113–119 (2015).
425. Ghys, P. D. *et al.* The associations between cervicovaginal HIV shedding, sexually transmitted diseases and immunosuppression in female sex workers in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS* **11**, (1997).
426. Malekinejad, M. *et al.* Risk of HIV acquisition among men who have sex with men infected with bacterial sexually transmitted infections: A systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Dis* **48**, e138 (2021).
427. Padian, N. S. *et al.* Diaphragm and lubricant gel for prevention of HIV acquisition in southern African women: a randomised controlled trial. *Lancet* **370**, 251–261 (2007).
428. Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L. & Delfraissy, J. F. Past, present and future: 30 years of HIV

- research. *Nat Rev Microbiol* **11**, 877–883 (2013).
429. Shen, R., Richter, H. E. & Smith, P. D. Early HIV-1 target cells in human vaginal and ectocervical mucosa. *Am J Reprod Immunol* **65**, 261–267 (2011).
430. Shen, R., Richter, H. E. & Smith, P. D. Interactions between HIV-1 and Mucosal Cells in the Female Reproductive Tract. *Am J Reprod Immunol* **71**, 608 (2014).
431. Coombs, R. W., Reichelderfer, P. S. & Landay, A. L. Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. *AIDS* **17**, 455–480 (2003).
432. Gonzalez, S. M., Aguilar-Jimenez, W., Su, R. C. & Rugeles, M. T. Mucosa: Key Interactions Determining Sexual Transmission of the HIV Infection. *Front Immunol* **10**, 144 (2019).
433. Hladik, F. & Hope, T. J. HIV infection of the genital mucosa in women. *Curr HIV/AIDS Rep* **6**, 20–28 (2009).
434. Carias, A. M. *et al.* Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract. *J Virol* **87**, 11388–11400 (2013).
435. Freeman, M. L. *et al.* Cytokines and T-Cell Homeostasis in HIV Infection. *J Infect Dis* **214** **Suppl 2**, S51–S57 (2016).
436. Liebenberg, L. J. P. *et al.* Genital—Systemic Chemokine Gradients and the Risk of HIV Acquisition in Women. *J Acquir Immune Defic Syndr* **74**, 318 (2017).
437. Burgener, A., McGowan, I. & Klatt, N. R. HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis. *Curr Opin Immunol* **36**, 22–30 (2015).
438. J. Schust, D. *et al.* Potential mechanisms for increased HIV-1 transmission across the endocervical epithelium during *C. trachomatis* infection. *Curr HIV Res* **10**, 218–227 (2012).
439. Buckner, L. R. *et al.* Chlamydia trachomatis Infection of Endocervical Epithelial Cells Enhances Early HIV Transmission Events. *PLoS One* **11**, (2016).
440. Herbst-Kralovetz, M. M., Pyles, R. B., Ratner, A. J., Sycuro, L. K. & Mitchell, C. New Systems for Studying Intercellular Interactions in Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis* **214**, S6 (2016).
441. Francés-Herrero, E. *et al.* Bioengineering trends in female reproduction: a systematic review. *Hum Reprod Update* (2022) doi:10.1093/HUMUPD/DMAC025.
442. Frouard, J., le Tortorec, A. & Dejuq-Rainsford, N. In vitro models for deciphering the mechanisms underlying the sexual transmission of viruses at the mucosal level. *Virology* **515**, 1–10 (2018).
443. Buckner, L. R. *et al.* Innate immune mediator profiles and their regulation in a novel polarized immortalized epithelial cell model derived from human endocervix. *J Reprod Immunol* **92**, 8–20 (2011).
444. Fichorova, R. N., Rheinwald, J. G. & Anderson, D. J. Generation of papillomavirus-immortalized cell lines from normal human ectocervical, endocervical, and vaginal epithelium that maintain expression of tissue-specific differentiation proteins. *Biol Reprod* **57**, 847–855 (1997).
445. Herbst-Kralovetz, M. M. *et al.* Quantification and comparison of toll-like receptor expression and responsiveness in primary and immortalized human female lower genital tract epithelia. *Am J Reprod Immunol* **59**, 212–224 (2008).
446. Fichorova, R. N., Yamamoto, H. S., Delaney, M. L., Onderdonk, A. B. & Doncel, G. F. Novel vaginal microflora colonization model providing new insight into microbicide mechanism of action. *mBio* **2**, (2011).
447. Ayehunie, S. *et al.* Organotypic human vaginal-ectocervical tissue model for irritation studies of spermicides, microbicides, and feminine-care products. *Toxicol In Vitro* **20**, 689–698 (2006).
448. Pyles, R. B. *et al.* Cultivated Vaginal Microbiomes Alter HIV-1 Infection and Antiretroviral Efficacy in Colonized Epithelial Multilayer Cultures. *PLoS One* **9**, e93419 (2014).
449. Hjelm, B. E., Berta, A. N., Nickerson, C. A., Arntzen, C. J. & Herbst-Kralovetz, M. M. Development and characterization of a three-dimensional organotypic human vaginal

- epithelial cell model. *Biol Reprod* **82**, 617–627 (2010).
450. Radtke, A. L. & Herbst-Kralovetz, M. M. Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models. *J Vis Exp* (2012) doi:10.3791/3868.
451. Introini, A., Vanpouille, C., Fitzgerald, W., Broliden, K. & Margolis, L. Ex Vivo Infection of Human Lymphoid Tissue and Female Genital Mucosa with Human Immunodeficiency Virus 1 and Histoculture. *J Vis Exp* **2018**, (2018).
452. Ñahui Palomino, R. A. *et al.* Extracellular vesicles from symbiotic vaginal lactobacilli inhibit HIV-1 infection of human tissues. *Nat Commun* **10**, (2019).
453. Mancini, V. & Pensabene, V. Organs-On-Chip Models of the Female Reproductive System. *Bioengineering* **6**, (2019).
454. Perelman, P. *et al.* A Molecular Phylogeny of Living Primates. *PLoS Genet* **7**, e1001342 (2011).
455. Estes, J. D., Wong, S. W. & Brenchley, J. M. Nonhuman primate models of human viral infections. *Nat Rev Immunol* **18**, 390–404 (2018).
456. Gardner, M. B. & Luciw, P. A. Macaque Models of Human Infectious Disease. *ILAR J* **49**, 220 (2008).
457. Satkoski Trask, J., George, D., Houghton, P., Kanthaswamy, S. & Smith, D. G. Population and Landscape Genetics of an Introduced Species (*M. fascicularis*) on the Island of Mauritius. *PLoS One* **8**, e53001 (2013).
458. van Esch, E. *et al.* Summary Comparison of Female Reproductive System in Human and the Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*). *Toxicol Pathol* **36**, 171S-172S (2008).
459. Shaikh, A. A., Naqvi, R. H. & Shaikh, S. A. Concentrations of oestradiol-17beta and progesterone in the peripheral plasma of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) in relation to the length of the menstrual cycle and its component phases. *J Endocrinol* **79**, 1–7 (1978).
460. Weinbauer, G. F. *et al.* Physiology and Endocrinology of the Ovarian Cycle in Macaques. *Toxicol Pathol* **36**, 7S (2008).
461. Bjornson-Hooper, Z. B. *et al.* A Comprehensive Atlas of Immunological Differences Between Humans, Mice, and Non-Human Primates. *Front Immunol* **13**, 908 (2022).
462. Marlin, R. *et al.* Modified Vaccinia Virus Ankara Vector Induces Specific Cellular and Humoral Responses in the Female Reproductive Tract, the Main HIV Portal of Entry. *J Immunol* **199**, 1923–1932 (2017).
463. Chen, Z. *et al.* Diversity of macaque microbiota compared to the human counterparts. *Scientific Reports 2018 8:1* **8**, 1–15 (2018).
464. Nugeyre, M. T. *et al.* Dynamics of Vaginal and Rectal Microbiota Over Several Menstrual Cycles in Female Cynomolgus Macaques. *Front Cell Infect Microbiol* **9**, (2019).
465. Cavarelli, M. *et al.* Leukocytospermia induces intraepithelial recruitment of dendritic cells and increases SIV replication in colorectal tissue explants. *Communications Biology 2021 4:1* **4**, 1–13 (2021).
466. Bell, J. D. *et al.* Nonhuman primate models used to study pelvic inflammatory disease caused by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Dis Obstet Gynecol* **2011**, (2011).
467. Qu, Y. *et al.* Comparable Genital Tract Infection, Pathology, and Immunity in Rhesus Macaques Inoculated with Wild-Type or Plasmid-Deficient *Chlamydia trachomatis* Serovar D. *Infect Immun* **83**, 4056–4067 (2015).
468. Patton, D. L. *et al.* The *Chlamydia trachomatis* Plasmid and CT135 Virulence Factors Are Not Essential for Genital Tract Infection or Pathology in Female Pig-Tailed Macaques. *Infect Immun* **86**, (2018).
469. Neildez, O. *et al.* Variation in virological parameters and antibody responses in macaques after atraumatic vaginal exposure to a pathogenic primary isolate of SIVmac251. *Res Virol* **149**, 53–68 (1998).

470. Balle, C. *et al.* Endocervical and vaginal microbiota in South African adolescents with asymptomatic Chlamydia trachomatis infection. *Scientific Reports 2018 8:1* **8**, 1–9 (2018).
471. Gosmann, C. *et al.* Lactobacillus-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities are Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women. *Immunity* **46**, 29 (2017).
472. The impact of vaginal microbial communities on immune cells essential for pathogen protection and epithelial integrity.
<https://virtual.keystonesymposia.org/ks/sessions/1015/view>.
473. Mirmonsef, P. *et al.* The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* **65**, 190 (2011).
474. Williams, B., Landay, A. & Presti, R. M. Microbiome alterations in HIV infection a review. *Cell Microbiol* **18**, 645–651 (2016).
475. Rizzo, A. *et al.* Lactobacillus crispatus mediates anti-inflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to Chlamydia trachomatis infection in vitro. *Int J Med Microbiol* **305**, 815–827 (2015).
476. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology 2013 13:3* **13**, 159–175 (2013).
477. Laniewski, P., Gomez, A., Hire, G., So, M. & Herbst-Kralovetz, M. M. Human Three-Dimensional Endometrial Epithelial Cell Model To Study Host Interactions with Vaginal Bacteria and Neisseria gonorrhoeae. *Infect Immun* **85**, (2017).
478. Petrova, M. I., van den Broek, M., Balzarini, J., Vanderleyden, J. & Lebeer, S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 762–792 (2013).
479. Jabbour, H. N., Sales, K. J., Catalano, R. D. & Norman, J. E. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction* **138**, 903–919 (2009).
480. Liew, P. X. & Kubes, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev* **99**, 1223–1248 (2019).
481. Kriek, J. M. *et al.* Female genital tract inflammation, HIV co-infection and persistent mucosal Human Papillomavirus (HPV) infections. *Virology* **493**, 247–254 (2016).
482. Bradley, F. *et al.* The vaginal microbiome amplifies sex hormone-associated cyclic changes in cervicovaginal inflammation and epithelial barrier disruption. *Am J Reprod Immunol* **80**, (2018).
483. Yang, C. *et al.* Chlamydia evasion of neutrophil host defense results in NLRP3 dependent myeloid-mediated sterile inflammation through the purinergic P2X7 receptor. *Nature Communications 2021 12:1* **12**, 1–16 (2021).
484. Ferreira, V. H., Kafka, J. K. & Kaushic, C. Influence of common mucosal co-factors on HIV infection in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* **71**, 543–554 (2014).
485. Schjenken, J. E. & Robertson, S. A. Seminal Fluid Signalling in the Female Reproductive Tract: Implications for Reproductive Success and Offspring Health. *Adv Exp Med Biol* **868**, 127–158 (2015).
486. Craenmehr, M. H. C. *et al.* Effect of seminal plasma on dendritic cell differentiation in vitro depends on the serum source in the culture medium. *J Reprod Immunol* **137**, (2020).
487. Sharkey, D. J. *et al.* TGF- β mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. *J Immunol* **189**, 1024–1035 (2012).
488. Alghamdi, A. S. *et al.* Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Anim Reprod Sci* **114**, 331–344 (2009).
489. Mateo-Otero, Y. *et al.* Seminal plasma, and not sperm, induces time and concentration-dependent neutrophil extracellular trap release in donkeys. *Equine Vet J* **54**, 415–426 (2022).
490. Hahn, S., Giaglis, S., Hoesli, I. & Hasler, P. Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. *Front Immunol* **3**, (2012).

491. Münch, J. *et al.* Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* **131**, 1059–1071 (2007).
492. Rivera, V. V., Cardona Maya, W. D. & Suárez, J. P. The relationship between sexually transmitted bacteria, microbiota and seminal quality in asymptomatic men. *Asian J Urol* (2021) doi:10.1016/J.AJUR.2021.09.004.
493. Jewanraj, J. *et al.* The Impact of Semen Exposure on the Immune and Microbial Environments of the Female Genital Tract. *Frontiers in Reproductive Health* **0**, 8 (2020).
494. Mngomezulu, K. *et al.* Recent Semen Exposure Impacts the Cytokine Response and Bacterial Vaginosis in Women. *Front Immunol* **12**, 695201 (2021).
495. Freeman, E. E. *et al.* Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS* **20**, 73–83 (2006).
496. Zayats, R., Murooka, T. T. & McKinnon, L. R. HPV and the Risk of HIV Acquisition in Women. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 6 (2022).
497. Martin, H. L. *et al.* Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* **180**, 1863–1868 (1999).
498. Xiao, S. *et al.* A microfluidic culture model of the human reproductive tract and 28-day menstrual cycle. *Nature Communications* 2017 8:1 **8**, 1–13 (2017).
499. Houzet, L. *et al.* Seminal Simian Immunodeficiency Virus in Chronically Infected Cynomolgus Macaques Is Dominated by Virus Originating from Multiple Genital Organs. *J Virol* **92**, (2018).
500. Zalenskaya, I. A. *et al.* Use of contraceptive depot medroxyprogesterone acetate is associated with impaired cervicovaginal mucosal integrity. *J Clin Invest* **128**, 4622 (2018).
501. Ray, R. M. *et al.* The contraceptive medroxyprogesterone acetate, unlike norethisterone, directly increases R5 HIV-1 infection in human cervical explant tissue at physiologically relevant concentrations. *Sci Rep* **9**, (2019).
502. Edfeldt, G. *et al.* Regular Use of Depot Medroxyprogesterone Acetate Causes Thinning of the Superficial Lining and Apical Distribution of Human Immunodeficiency Virus Target Cells in the Human Ectocervix. *J Infect Dis* **225**, 1151–1161 (2022).

ANNEXES

Annexe 1 : Revue 1

« The human vaginal microbiota, its regulation and its role on inflammation and sexually transmitted infection acquisition. Can the Non Human Primate model contribute to a better understanding of the mechanisms ? »

Revue soumise à *Frontiers in Reproductive Health*, section *Gynecology*

The human vaginal microbiota, its regulation and its role on inflammation and sexually transmitted infection acquisition. Can the Non-Human Primate model contribute to a better understanding of the mechanisms?

Cindy Adapen¹, Louis REOT², Elisabeth Menu^{2, 3*}

¹INRA UMR1319 Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé, France, ²Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-immune, Hematological and Bacterial diseases (IMVA-HB/IDMIT), France, ³Mucosal Immunity and Sexually Transmitted Infection Control (MISTIC) Group, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France., France

Submitted to Journal:
Frontiers in Reproductive Health

Specialty Section:
Gynecology

Article type:
Review Article

Manuscript ID:
992176

Received on:
12 Jul 2022

Journal website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

C.A. wrote the first draft of the manuscript, designed the figures and did subsequent edits. L.R. completed the first draft and subsequent edits in the text and the figures. E.M. provided critical feedback and edits on the work throughout. The authors approved the final edit of the manuscript as submitted. All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship.

Keywords

vaginal microbiota, Inflammation, Cytokines, Neutrophils, sexually transmitted infections, non-human primates

Abstract

Word count: 177

The human vaginal microbiota has a central role in the regulation of the female reproductive tract (FRT) inflammation. Indeed, on one hand an optimal environment leading to a protection against sexually transmitted infections (STI) is associated with a high proportion of *Lactobacillus* spp (eubiosis). On the other hand, a more diverse microbiota with a high amount of non-*Lactobacillus* spp (dysbiosis) is linked to a higher local inflammation and an increased STI susceptibility. The composition of the vaginal microbiota is influenced by numerous factors that may lead to a dysbiotic environment.

In this review, we first discuss how the vaginal microbiota composition affects the local inflammation with a focus on the cytokine profiles, the immune cell recruitment/phenotype and a large part devoted especially on the interactions between the vaginal microbiota and the neutrophils. Secondly, we analyze the interplay between STI and the vaginal microbiota and describe several mechanisms of action of the vaginal microbiota. Finally, the input of the NHP model in research focusing on the FRT health including vaginal microbiota or STI acquisition/control and treatment is discussed.

Contribution to the field

Nowadays, the interplay between vaginal microbiota, female reproductive tract inflammation and acquisition of sexually transmitted infection is known however the mechanisms of action are not completely understood. This work summarizes the knowledge obtained in this field during the past years surrounding the vaginal microbiota and its central role in the regulation of the immunity. It highlights how the composition of the vaginal microbiota can modulate the inflammation including cytokine production and immune cell recruitment. This review particularly focuses on the interplay between neutrophils and microbiota which have been poorly studied in the vaginal compartment. Many studies in this research topic are performed in Human however relevant animal models can contribute to this field. Indeed, non-human primate, that carries numerous similarities with Human, can be used to study probiotic/prebiotic testing, sexually transmitted infection and control in a physiologically relevant model. Overall, this review addresses the interaction between vaginal microbiota composition, inflammation and sexually transmitted infection as well as discusses the contribution of non-human primate in this research field.

Funding statement

This work did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

The human vaginal microbiota, its regulation and its role on inflammation and sexually transmitted infection acquisition. Can the Non-Human Primate model contribute to a better understanding of the mechanisms?

1 **Cindy Adapen¹, Louis Reot², Elisabeth Menu^{2,3*}**

2 ¹Micalis Institute, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

3 ²Université Paris-Saclay, Inserm, Commissariat à l'énergie Atomique et aux énergies Alternatives
4 (CEA), Center for Immunology of Viral, Auto-Immune, Hematological and Bacterial Diseases
5 [IMVA-HB/Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT)], Fontenay-aux-Roses,
6 France.

7 ³Mucosal Immunity and Sexually Transmitted Infection Control (MISTIC) Group, Department of
8 Virology, Institut Pasteur, Paris, France.

9 *** Correspondence:**

10 Elisabeth Menu
11 elisabeth.menu@cea.fr

12 **Keywords:** Vaginal microbiota, Inflammation, Cytokines, Neutrophils, Sexually transmitted
13 infections, Non-Human Primates

14 **Abstract**

15 The human vaginal microbiota has a central role in the regulation of the female reproductive tract
16 (FRT) inflammation. Indeed, on one hand an optimal environment leading to a protection against
17 sexually transmitted infections (STI) is associated with a high proportion of *Lactobacillus spp*
18 (eubiosis). On the other hand, a more diverse microbiota with a high amount of non-*Lactobacillus spp*
19 (dysbiosis) is linked to a higher local inflammation and an increased STI susceptibility. The
20 composition of the vaginal microbiota is influenced by numerous factors that may lead to a dysbiotic
21 environment.

22 In this review, we first discuss how the vaginal microbiota composition affects the local inflammation
23 with a focus on the cytokine profiles, the immune cell recruitment/phenotype and a large part devoted
24 especially on the interactions between the vaginal microbiota and the neutrophils. Secondly, we
25 analyze the interplay between STI and the vaginal microbiota and describe several mechanisms of
26 action of the vaginal microbiota. Finally, the input of the NHP model in research focusing on the FRT
27 health including vaginal microbiota or STI acquisition/control and treatment is discussed.

28 **1 Introduction**

29 The female reproductive tract (FRT) is one of the entry points of sexually transmitted pathogens and
30 includes a wide array of immune parameters necessary to abrogate pathogen invasion. The FRT is
31 divided into an upper tract, composed of the Fallopian tubes, ovaries, uterus and endocervix and a
32 lower tract, with the ectocervix and the vagina. The two compartments differ in their architecture, with

33 two distinct types of mucosae (type I and II). The uterus and endocervix are characterized by a simple
 34 columnar epithelium (type I) formed by a layer of ciliated columnar cells connected by tight junctions.
 35 Type I epithelium expresses polymeric Ig receptor (pIgR) facilitating the passage of dimeric IgA into
 36 the lumen (1). The upper tract is characterized by microfold cells (M cells), the presence of mucosa
 37 associated lymphoid tissue (MALT) and secretory IgA antibodies (2). The lower tract (vagina and
 38 ectocervix) is made of multiple layers of non-keratinized stratified squamous epithelium (type II). The
 39 type II epithelium is characterized by the presence of Langerhans cells (LC) and production of IgG
 40 antibodies. The critical zone for pathogen invasion is the transformation zone, located between the
 41 upper and lower tract, where the multilayer squamous epithelium changes to a single layer of columnar
 42 epithelial cells (3). The transformation zone is immunologically active, the change of epithelium
 43 architecture allows the passage of small pathogens to the mucosa. The lower tract epithelium permits
 44 the protection of underlining tissues from abrasion during intercourse. However, the lack of tight
 45 junction allows intra-epithelial passage of molecules, small pathogens and interaction of these
 46 pathogens with potential target cells. The epithelial barrier in the upper and lower tracts acts as a
 47 physical barrier but can also recognize Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) through
 48 Pattern recognition receptors (PRR) like Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR) and
 49 induces the production of cytokines, chemokines and antimicrobial peptides (AMP) (4,5). A layer of
 50 mucus, covering the epithelium of the FRT, is in direct contact with pathogens. The mucus acts as a
 51 physical trap for pathogens thanks to gel-like properties(6).

52 Macrophages, NK cells, dendritic cells (DC) and neutrophils have a variable distribution according to
 53 FRT compartments and hormonal levels (4,7). Other innate-like lymphocyte cells such as $\gamma\delta$ and
 54 mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are also present within the FRT(8,9). At steady state,
 55 there is a high number of neutrophils, DC or LC, macrophages and NK cells in the upper genital tract,
 56 and a lower number in the lower tract (4,10). T lymphocytes are the most abundant leukocytes in the
 57 FRT(11,12). The transformation zone contains the highest concentration of macrophages, CD4+ and
 58 CD8+ T cells compared to all FRT compartments (13). In the upper tract, there are also lymphoid
 59 aggregates (LA), composed of an inner core of B cells surrounded by CD8+ T cells and an outer halo
 60 of macrophages, which are not found in the lower tract (14). IgA and IgG are found in the FRT, and
 61 IgG concentration is higher than IgA in cervicovaginal fluids (15). B cells are mainly found in the
 62 cervix and vagina and are more abundant in the ectocervix compared to the endocervix in
 63 premenopausal women (12,16).

64 Hormonal changes in the FRT induce several modifications of the immune system involving secreted
 65 molecules (AMPs, cytokines and chemokines), epithelial cells, fibroblasts, immune cells and vaginal
 66 microbiota (16).

67 In humans, eubiotic vaginal microbiota is characterized by the dominance of one genus, *Lactobacillus*
 68 *spp.*, which maintains an acidic pH in the vagina (pH = 4 to 5) thanks to lactic acid production. It also
 69 maintains a low inflammatory environment through the production of bactericide and bacteriostatic
 70 components (Figure 1). Analysis of the vaginal microbiota by 16S rRNA gene sequencing and vaginal
 71 pH measurement allowed a community clustering into five groups or community state type (CST) (17).
 72 Group I, II, III and V are dominated by one species of *Lactobacillus spp.*: *L. crispatus* (group I), *L.*
 73 *gasseri* (group II), *L. iners* (group III) and *L. jensenii* (group V). Women from the group I had a pH
 74 around 4, and the other groups dominated by *Lactobacillus spp.* had a slightly higher pH between 4,4
 75 to 5. Women from the group IV had a vaginal microbiota characterized by higher proportions of
 76 anaerobic bacteria (facultative or strict other than *Lactobacillus spp.*) including *Prevotella*, *Dialister*,
 77 *Atopium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Mobiluncus*, with a vaginal pH starting
 78 at 5 and rising up to more than 5,5. The group IV can be divided into two subgroups: characterized by
 79 a microbiota with a modest proportion of *Lactobacillus spp.* and a low number of various species of
 80 anaerobic bacteria (such as *Anaerococcus*, *Corynebacterium*, *Fingoldia* or *Streptococcus*) (group
 81 IVa), or dominated by diverse anaerobic bacteria belonging to the genus *Atopium*, *Prevotella*,

82 *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella* or *Mobiluncus* (group IVb) (18). This diverse vaginal microbiota
 83 composition has been associated with local inflammation, characterized by an increase in pro-
 84 inflammatory cytokines and the presence of activated cells, which in turn increase the susceptibility to
 85 sexually transmitted infections (STIs) and poor obstetrics events (19,20) (Figure 1). This increased
 86 bacterial diversity associated with high anaerobic bacteria abundance, low *Lactobacillus spp*
 87 abundance and high local inflammation, leads to a clinical condition called bacterial vaginosis (BV).
 88 BV is also associated to a modification of metabolomic profiles. Srinivasan et al. have demonstrated a
 89 strong metabolic signature in women suffering from BV, correlating with the presence and abundance
 90 of specific bacteria. In BV+ women, several metabolites are associated with BV clinical criteria:
 91 elevated pH (increase of tyramine, cadaverine, N-acetylputrescine, sphingosine and decrease in
 92 tyrosine and glutamate), vaginal discharge (increase of cadaverine and agmatine), presence of clue
 93 cells (increase of deoxycarnitine, pipercolate and decrease of glutathione, glycylproline) and amine odor
 94 (increase of N-acetylputrescine and decrease in lactate, phenylalanine). A group of BV associated
 95 bacteria (including *Megashaera*, *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Sneathia sanguinegens*, *Parvimonas micra*,
 96 *Dialister*, *Prevotella timonensis* and BVAB2) were highly correlated with metabolites associated with
 97 BV (succinate, cadaverine, putrescine, tyramine and deoxycarnitine). On the contrary, *L. crispatus* and
 98 *L. jensenii* abundance have been described to correlate positively with other metabolites such as sugars,
 99 lactate, amino acids and dipeptides, but negatively correlated with tyramine, pipercolate, cadaverine
 100 putrescine and agmatine, which are increased in BV+ women (Figure 1). *L. iners* exhibited
 101 intermediate correlation patterns between *L. crispatus/L. jensenii* and BV associated bacteria (21). *G.*
 102 *vaginalis* is often associated with BV and the predominant agent inducing biofilm. This bacterium was
 103 present in all the patients suffering from BV. However, it was also observed in 59% of BV- patients,
 104 suggesting that *G. vaginalis* is also present in healthy women (22). *G. vaginalis* alone does not
 105 systematically induce BV (23), but has a central role in BV acquisition by being a part of a group of
 106 organisms including *Atopium*, *Megashaera*, *Sneathia* and BVAB1/2/3 involved in the induction of a
 107 dysbiotic environment. A recent review discusses a BV model in four steps involving several bacteria:
 108 (1) *G. vaginalis* colonization will remove *Lactobacillus* and initiates biofilm production, (2) *G.*
 109 *vaginalis* will facilitate the growth of *Prevotella bivia*, (3) production of enzymes along with vaginal
 110 sialidase by *G. vaginalis* and *P. bivia* will induce the breakdown of the mucus layer (4), the loss of the
 111 mucus barrier will favor the colonization by other anaerobic bacteria, such as *A. vaginae*, inducing a
 112 pro-inflammatory environment (24).

113 Various factors are known to influence the vaginal microbiota composition, such as hormones,
 114 contraceptive use, hygiene, sexual behaviors, semen, ethnic status and STIs (25–34) Other factors
 115 including nutrition, stress or tobacco use have also been shown to influence the vaginal microbiota
 116 composition (35–38) (Figure 2).

117 Here, we address the interplay between vaginal microbiota composition and vaginal inflammation at
 118 steady state and in the context of a STI. Finally, we discuss animal models and more precisely non-
 119 human primate (NHP) use to study vaginal microbiota composition and its link to local inflammation.

120 2 The vaginal microbiota and inflammation

121 2.1 Cytokine production

122 The vaginal microbiota has been described to be closely linked to FRT inflammation (Figure 1).
 123 Indeed, the vaginal microbiota characterization of 236 HIV uninfected women from the FRESH
 124 (Female Rising through Education, Support and Health) cohort showed that women with CST-IV were
 125 four times more likely to have elevated genital pro-inflammatory cytokines, compared to those with
 126 CST-I-III. More precisely, IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-8, IL-12-p70, IL-4, IL-10, and FMS-like
 127 tyrosine 3 ligand (FLT-3L) were significantly increased in women with CST-IV compared to women

128 with CST-I. Women with CST-III exhibited a less pronounced increase in cytokine levels, with only
 129 significant higher level of IFN γ and a trend towards higher TNF α , IL-8 and IL-10. Six bacteria in
 130 women with CST-IV were highly correlated with inflammation: *Fusobacterium*, *Aerococcus*, *Sneathia*,
 131 *Gemella*, *Mobiluncus* and *Prevotella* (19). K. Lennard et al. identified the same bacteria as well as
 132 other species associated with inflammation, such as BVAB1/2/3, *Prevotella amnii* and *pallens*, *P.*
 133 *micra*, *Megasphaera*, *G. vaginalis* and *A. vaginae* in South African women aged 16 to 22 years old
 134 (39). In addition, L. Masson et al. have determined that elevated expression of IL-1 α , IL-1 β and
 135 decrease of CXCL10 were associated with BV in HIV-1 negative young women (> 500). Those
 136 markers were proposed by the authors to be used as biomarker for asymptomatic STI or BV (40). In
 137 addition, Jaspers et al. associated a better vaginal health with a low concentration of IL-1 β , IL-8 and
 138 IL-12(p70) and an increased concentration of CXCL10 (41). In another study conducted on
 139 cervicovaginal lavages (CVL), obtained from an African cohort, the authors observed an increase of
 140 IL-1 α , IL-1 β , G-CSF, GM-CSF and a decrease of CXCL10 in women suffering from dysbiosis (42).
 141 In *in vitro* experiments, epithelial endocervical (End1)/ectocervical (Ect1) and vaginal cell line (VK2)
 142 were exposed to a high concentration of bacteria from the vaginal microbiota. Cells showed an
 143 increased inflammation when they were exposed to *G. vaginalis* or *A. vaginae* compared to *L.*
 144 *johnsonii*. Indeed, 24h post-interaction, the authors observed significant higher levels of IL-1 β , IL-6,
 145 IL-8, G-CSF, PDGF, CXCL10, MIP-1 β and Gro- α in all epithelial cell lines exposed to *G. vaginalis*
 146 or *A. vaginae*, with *A. vaginae* exhibiting a more robust cytokine response than *G. vaginalis*. Other
 147 cytokines were increased such as IL-1RA, IL-10, IL12(p70), CCL5 and IL-1 α . Moreover, *A. vaginae*
 148 induced an increased expression of defensins (HBD2, HBD3) in End1 cells. However, a difference in
 149 CXCL10 expression has to be noted between *in vitro* and *in vivo* analysis (43). Similar results were
 150 observed for *A. vaginae* or *G. vaginalis* in a 3D model of human cervix: polymicrobial exposition led
 151 to an increase production of IL-1 α , IL-6, IL-8, CCL2, CCL20 and IL-1 β compared to no bacterial
 152 exposition or *L. crispatus* exposition (44).
 153 CVL from 50 Rwandan female sex workers were collected and their microbiota and proteome were
 154 analyzed. The microbiota was clustered in four groups: *L. crispatus* dominated microbiota (group 1),
 155 *L. iners* dominated microbiota (group 2), moderate dysbiosis (group 3) and severe dysbiosis (group 4).
 156 MUC5B was increased from groups 1 to 4 and MUC5AC was increased in group 4 compared to other
 157 groups, which could be explained by an increased production of mucus, or by the degradation of the
 158 mucus by BV associated bacteria. Indeed, *G. vaginalis* was observed to degrade MUC1 compared to
 159 *L. crispatus* in a 3D model of human cervix (44). In the Rwandan female sex workers cohort,
 160 cytoskeleton alterations (increased actin-organizing proteins, decreased keratins and cornified
 161 proteins) were observed in groups 3 and 4. Furthermore, there was an increased trend for cell death
 162 from group 1 to 4, reflecting cell damage also described in the 3D model of human cervix exposed to
 163 *A. vaginae* (44). Histones (HIST3H2A, HIST2H3A/C/D, HIST4H4) and AMP such as psoriasin or
 164 calprotectin were increased from group 1 to 4. Besides, proteasome core complex proteins, proteases
 165 and proteins involved in catabolism were also induced in dysbiosis women. Moreover, a pro-
 166 inflammatory cytokine, IL-36, was increased in women suffering from dysbiosis (45). Another study
 167 evaluated lactic acid treatment of cervicovaginal epithelial cell lines, with physiologically
 168 concentrations of short chain fatty acid (SCFA), and described the induction of an anti-inflammatory
 169 environment (increase of IL-1RA). Moreover, lactic acid and SCFA mixture significantly decreased
 170 the expression of IL-6, IL-8, CXCL10 and CCL20 upon stimulation with TLR1/2 and TLR3 agonists.
 171 On the contrary, higher concentration of SCFA, compared to lactic acid, induced an increased
 172 expression of TNF α and a decreased expression of CCL5 and CXCL10 upon TLR stimulation,
 173 suggesting that elevated SCFA might be responsible for the increased inflammation observed in the
 174 vagina of BV+ women (46).

175

176 **2.2 Cell recruitment and phenotype**

177 The vaginal microbiota has also an impact on immune cell recruitment and phenotype (Figure 1). In a
178 BV+ mouse model colonized by *G. vaginalis*, oral administration of *L. acidophilus* efficiently inhibits
179 NF- κ B pathways as well as IL-1 β , IL-17, TNF α and increases IL-10 and Foxp3 expression. Moreover,
180 the *Lactobacillus* species inhibited, *in vitro*, the differentiation of mice splenocytes into Th17 cells but
181 increased their differentiation into Tregs (47). Similarly, *in vitro* experiment described that *G. vaginalis*
182 was able to increase the production of IL-17, whereas *Lactobacillus spp.* induced a higher level of
183 IFN γ . The authors suggested that BV associated bacteria might induce a Th17 response that may impair
184 antiviral response and facilitate disease progression (48). Women with a diverse vaginal microbiota
185 with low *Lactobacillus spp.* abundance (CST-IV) had a 17-fold increase in HIV-1 target cells in the
186 FRT with elevated CCL3 and CCL5, which attracts CCR5+ cells. CVL of women with CST-IV had
187 higher levels of IL-1 α , TNF α , IL-8, IL-12p70, IFN γ , IL10, IL-17 and IL-17 inducing cytokines IL-23
188 and IL-1 β . Moreover, vaginal inoculation of *P. bivia* in germ free mice promoted the recruitment in
189 the FRT of CCR5+ CD4+ T cells compared to mice inoculated with *L. crispatus*. This inflammation
190 suggested an increased susceptibility to HIV-1 for women with CST-IV due to an increase of HIV-1
191 target cells (CD4+ T cells and Th17 cells) and local pro-inflammatory cytokines (49). In terms of Treg,
192 A. Semaganda et al. described no association between vaginal microbiota and endocervical Treg in a
193 small cohort. However, they suggested that Treg might be important in the regulation of inflammation
194 induced by BV associated bacteria but do not affect directly the presence of BV associated bacteria
195 (50). Cervical cytobrushes of HIV exposed seronegative women (HESN) exhibited an elevated level
196 of antiviral cytokines, a decrease of pro-inflammatory chemokines and soluble IgA and IgG, and an
197 increased frequency of NK cells, CXCR5+ CD8+ T cells, follicular T cells compared to HIV unexposed
198 healthy women (UH). In terms of vaginal microbiota, the HESN cohort exhibits a higher bacterial
199 diversity but with an increased abundance of *L. crispatus*, *L. gasseri* and *L. iners* compared to UH
200 cohort. These parameters may explain the protection of HESN from HIV-1 infection (51). In contrast,
201 Lennard et al. did not find any differences in the frequency of CD4+ CCR5+ cells in cervical
202 cytobrushes of BV+ women, suggesting the implication of other factors in the increased susceptibility
203 of BV+ women to HIV-1 (39). No differences were detected in CD11+ DC or CD14+ monocytes and
204 macrophages frequency in cervical cytobrushes when comparing BV+ and BV- women. However, in
205 women with highly diverse microbiota, there were gene upregulations for NF- κ B, TLR, NOD like
206 receptor and TNF α signaling pathways in cervical APCs, most likely with LPS acting as the upstream
207 regulator. CD4+ T cells frequency, obtained from cervical cytobrushes for those women, were higher
208 and cells were more activated (HLA-DR+, CD38+, CCR5+) (19). RNA sequencing of isolated cell
209 populations from cervical cytobrushes highlight that antigen presenting cells (APC) is the main cell
210 population involved in FRT inflammation. The authors detected that gene upregulation in APC isolated
211 from dysbiotic patients are involved in cell growth suppression, apoptosis, inflammatory pathways,
212 neoplastic suppression and pro-proliferative pathways (52). BV+ women treated with 500 mg of
213 metronidazole for 7 days (twice daily), but who did not resolve the infection, exhibited higher levels
214 of IL-1 β , TNF α and ICAM-1 and lower levels of SLPI and GRO- α compared to BV- women.
215 *Gardnerella* species were higher in samples from women having an unresolved BV. Ectocervical
216 tissues of BV- women harbored higher number of CD45+ cells, including CD3+, CD8+ and HLA-DR+
217 cells. Nevertheless, BV+ women had higher number of CD4+ and CCR5+ cells (53).

218 Overall, polymicrobial vaginal microbiota composition has been associated with an increased
219 inflammation (higher pro-inflammatory cytokines production, upregulation of signaling pathways
220 involved in inflammation, cell recruitment), epithelial barrier disruption, mucus impairment,
221 cytoskeleton alteration and increased cell deaths (Figure 1).

222

223 2.3 Neutrophils and microbiota

224 2.3.1 Neutrophils in the FRT

225 Neutrophils are key mediators of inflammation and are present in all the compartments of the FRT
 226 (Figure 2). The highest presence of neutrophils is in fallopian tubes and this number decreases from
 227 the upper to the lower tract (54). In humans, neutrophils in fallopian tubes have been described to be
 228 phenotypically and functionally different from the neutrophils in the blood. Indeed, they expressed
 229 lower level of CD66b, CD62L, IL-8 receptor (CXCR1, CXCR2) and higher level of bacterial product
 230 receptor, CD64, HLA-DR, IFN γ , TNF α , IL-12 and VEGF compared to blood neutrophils (55). In the
 231 uterus, a strong increase of IL-8 before the menstruation leads to a significant recruitment of
 232 neutrophils, mainly through CXCR2 signaling pathway (56,57). Their role during menstruation is to
 233 allow the disruption of endometrial tissue through the release of elastase, which activates extracellular
 234 matrix-metalloproteinases and increases immune defense (4). In a mouse model, neutrophil depletion
 235 induces a blockade of the estrous cycle due to a dysregulation of serum steroid hormone levels,
 236 suggesting an important role of neutrophils in regulating hormone levels (58). Estradiol treatment of
 237 mice infected with *C. albicans* blocked neutrophil migration to the vagina and accumulated them in
 238 the ectocervix and fornix. This phenomenon is mediated by an altered expression of CD44 and CD47
 239 expression of FRT epithelial cells enabling neutrophils to migrate to the vagina. On the contrary,
 240 progesterone treatment facilitates neutrophil migration and killing. These data suggested that
 241 neutrophil migration is dependent on sex hormones. Indeed, during the ovulation, neutrophils are not
 242 present in the vaginal lumen in order to facilitate the passage of sperm cells, although it may lead to
 243 vaginal infections (59).

244 Recently, we have described the phenotype of neutrophils in cervicovaginal cytobrushes obtained from
 245 female macaques and shown that they are different from neutrophils in the blood. We used several
 246 surface markers to characterize the priming (CD11b, CD62L), activation (CD11b, CD32a) or
 247 maturation (CD10, CD101) status of the neutrophils. We observed three main cervicovaginal
 248 neutrophil populations: CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁺ CD32a⁺ (mature/activated), CD11b^{high} CD101⁺
 249 CD10⁻ CD32a⁺ (immature/activated) and CD11b^{low} CD101^{low} CD10⁻ CD32a⁻ (pre-neutrophil like). The
 250 proportion of those populations varied during the menstrual cycle. During menstruation, there was an
 251 increase of CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁺ CD32a⁺ subset of neutrophils, which expressed higher levels of
 252 CD62L than other populations of cervicovaginal neutrophils. (60)

253 Very few is known about the relationship between the vaginal microbiota and local neutrophils in the
 254 FRT. However, neutrophils are well known for controlling the gut microbiota composition, and the gut
 255 microbiota is crucial for the development, maturation and functions of neutrophils (61). We will now
 256 discuss how the relationships between the microbiota and neutrophils are important to modulate the
 257 inflammation at the level of the FRT.

258 2.3.2 Regulation of the microbiota by neutrophils

259 2.3.2.1 Neutrophil recruitment and activation

260 Neutrophils are among the most abundant immune cells in the vaginal lumen (60,62). They are rapidly
 261 recruited to the mucosa during the inflammation process and thus are crucial for maintaining the
 262 balance between commensals and pathogens at the level of the vaginal microbiota. In BV+ women,
 263 elevated vaginal level of IL-8 and IL-1b has been correlated to the presence of pathogenic bacteria,
 264 leading to a high neutrophil count (63). On the contrary, many probiotic strains of *Lactobacillus* have
 265 been shown to induce lower TLR response compared to pathogenic strains *in vitro*(64,65). This may
 266 lead to an activation of neutrophils that depends on the vaginal microbiota composition. For example,
 267 in the gut, during dysbiosis, neutrophil migration to the lumen is enhanced and they generate structures
 268 that encapsulate commensals and limit their contact with the epithelium(66). Upon pathogen

269 recognition, neutrophil activation is also known to increase various surface markers expression
270 (CD32a, CD11b, $\alpha_M\beta_2$ integrin ...), enabling neutrophil cytotoxic functions (67).

271 **2.3.2.2 Regulation of neutrophil function**

272 Neutrophils can elicit a vast antimicrobial response and impact the microbiota composition. For
273 example, upon pathogen recognition, neutrophils can produce various AMPs and proteins, through
274 granule secretion, and those AMPs are important for the containment of the microbiota (68). Mice
275 deficient in cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP), the ortholog of cathelicidin, exhibit a
276 significant dysbiosis of the gut (increased level of bacteria from the oral cavity) which result in a higher
277 susceptibility to colitis and azoxymethane-mediated carcinogenesis (69). Although this study did not
278 investigate the vaginal microbiota, neutrophil AMP might also participate to the containment of the
279 microbiota in other mucosal sites.

280 Reactive oxygen species (ROS) are produced by local neutrophils in the FRT (70), and contribute in
281 the one hand to enhance the oxidative stress induced by *Lactobacillus* H₂O₂ production, leading to
282 killing or restriction of pathogen growth (71), and on the second hand, they mediate neutrophil
283 extracellular trap (NETs) production. NETs are networks composed of DNA and neutrophil proteins
284 that can bind pathogens and facilitate their killing by neutrophils. In the lung, NET production
285 contributes to pathogen protection (72). However, in the FRT, exaggerated NET formation could lead
286 to infertility since NETs can also damage endogenous cells. The vaginal microbiota could also have an
287 indirect effect on NET release by neutrophils. Indeed, cervical mucins have been described to have
288 anti-inflammatory properties, leading to the inhibition of NET release in the FRT (73). The vaginal
289 microbiota composition is able to regulate the cervicovaginal mucus (CVM). Indeed, anaerobic
290 bacteria can degrade the CVM (74), and thus could enhance indirectly NET production through the
291 lifting of NET release inhibition induced by mucins.

292 In conclusion, neutrophils are important to control the vaginal microbiota and respond to pathogens,
293 but there is also a need to maintain a balance between recruitment/activation of the neutrophils and
294 tolerance of the microbiota to prevent various reproductive health issues including infertility. The
295 microbiota also produces numerous components and metabolites that can have an impact on neutrophil
296 production, maturation and functions.

297 **2.3.3 Regulation of neutrophils by the microbiota**

298 **2.3.3.1 Regulation of neutrophil production and maturation**

299 The gut microbiota is known to play a fundamental role for neutrophil production. Antibiotic treatment
300 of pregnant mice induces an altered gut microbiota with a reduced number of intestinal bacteria in
301 neonates. Following birth, neonates continued to receive antibiotics and exhibited an altered
302 granulopoiesis (decrease of bone-marrow neutrophils, level of plasma G-CSF and IL-17A in the
303 intestine) compared to naïve mice. Absence of the gut microbiota decreased the number of IL-17
304 producing cells in the intestine and consequent production of G-CSF. LPS stimulation through
305 TLR4/MyD88 signaling pathway promotes IL-17 producing cells in the intestine leading to
306 granulocytosis. Antibiotics-exposed neonates treated with G-CSF had an improved resistance to
307 bacterial infection compared to untreated antibiotics exposed neonates, and exhibited an increased
308 number of circulating neutrophils (75). In another study, performed in patients receiving hematopoietic
309 cell transplantation after chemotherapy, a relationship between the gut microbiota and immune cell
310 recovery was observed. Indeed, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* and *Akkermansia* were associated
311 with an increased number of neutrophils and, on the contrary, *Rothia* and *Clostridium* were negatively
312 associated with neutrophil number (76).

313 Those results show that the microbiota is essential in the production of neutrophils in the gut but
314 nothing has been reported yet in the FRT (75) .

315 A cohort study in South Africa followed BV+ women treated by oral metronidazole (77). During BV,
 316 their vaginal microbiota, dominated by anaerobic bacteria, was closely associated with genital
 317 inflammation. After treatment, the authors observed a reduced abundance of BV-associated bacteria
 318 (*G. vaginalis* and *A. vaginae*) and an increase in *L. iners*, significantly associate with a reduction of the
 319 level of proinflammatory cytokines. Interestingly, in this study, GM-CSF increased following
 320 metronidazole treatment, and appeared to be associated with the abundance of *L. crispatus*. Although
 321 the authors did not monitor hematopoietic cell proliferation and differentiation, this result could
 322 suggest that the vaginal microbiota could be involved in neutrophil production.

323 2.3.3.2 Regulation of neutrophil circulation

324 The circadian circulation of neutrophils is also influenced by the microbiota. In germ free mice, *K.*
 325 *pneumoniae* lung infection leads to a limited neutrophil mobilization favoring the pathogen growth
 326 (78). Microbiota depletion in mice induces a reduced number of aged neutrophils (CD62L⁻, CXCR4⁺)
 327 in the blood, and exhibit significant reductions in neutrophil adhesion/Mac-1 activation compared to
 328 untreated mice, leading to a retention of neutrophils in the circulation(79). Both observations can be
 329 partially restored by LPS treatment. Myd88, TLR2 and TLR4 knockout mice also exhibit less aged
 330 neutrophils, suggesting a role of the microbiota in priming neutrophils (79). Another paper has shown
 331 that administration of *L. acidophilus* induced a decrease in pro-inflammatory cytokines (IL-8, TNF α ,
 332 IL-6), immunoregulative cytokines (IL-4, IL-10), neutrophil and macrophage infiltrates as well as a
 333 reduced injury severity in rats suffering from colitis (80). The microbiota could have a local effect on
 334 epithelial cells leading to the recruitment of neutrophils, and a distal effect through secretion of
 335 metabolites that diffuse into the blood. Indeed, it has been shown that low concentrations of TLR
 336 ligands such as LPS can be detected in the bone marrow and induced neutrophil trafficking into the
 337 blood (81). It has also been shown that bacteria from the gut microbiota can produce short-chain fatty
 338 acids (SCFA), and could have an impact on neutrophil recruitment at the site of inflammation (82).

339 2.3.3.3 Regulation of neutrophil functions

340 The microbiota can have a direct or indirect effect (for example, by modulating the inflammation) on
 341 neutrophil functions. Neutrophils isolated from germ-free or antibiotics treated mice exhibit decreased
 342 antimicrobial functions, such as a decreased in myeloperoxidase activity (83), in phagocytic capacity
 343 (84) or a reduction in NET formation (79).

344 Metabolites such as short chain fatty acid, secondary bile acid lithocholic acid or histamine produced
 345 by the microbiota, modify ROS production or phagocytosis activity in neutrophils. This effect is
 346 notably mediated by histone deacetylase (HDAC) or G protein coupled receptor (61,85). SCFA
 347 produced in the colon by bacterial fermentation of polysaccharides are mainly composed of butyrate,
 348 propionate and acetate. Butyrate and propionate inhibit pro-inflammatory cytokines (TNF α and
 349 cytokine induced neutrophil chemoattractant-2) and nitric oxide production by LPS stimulated
 350 neutrophils (rat model). Moreover, those SCFA are also able to inhibit HDAC and NF- κ B activation,
 351 which might explained the decrease in pro-inflammatory cytokines (86). In a mouse model for
 352 endometritis, a dysbiosis was induced in the gut microbiota, and uterine colonization of *S. aureus* led
 353 to endometrial inflammation, associated with increased pathogen load in the uteri of the mice with gut
 354 microbiota-dysbiosis associated with a low phagocytic capacity and responsiveness of neutrophils. A
 355 fecal microbiota transplantation was then performed, and those effects were reversed. The authors
 356 demonstrated that protective effect was due to SCFAs present in the feces of mice and that diffuse into
 357 the blood but also in uterine tissues.

358 Most of the mechanisms for neutrophil regulation were observed in the gut, but might also be
 359 important in the vagina in terms of neutrophil priming and function for instance. *Lactobacillus*
 360 impact on neutrophils might also occurred in the vagina. Interestingly, R. Cheu et al. have observed

361 an activation of cervicovaginal neutrophils, as well as a delay in neutrophils apoptosis leading to
 362 neutrophil accumulation within the vagina of women suffering from bacterial vaginosis [Keystone
 363 2018].

364 **3 Vaginal microbiota and STI**

365 **3.1 Interaction between STI and the vaginal microbiota**

366 **3.1.1 Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Candida albicans**

367 The vaginal microbiota of adolescent girls or women dominated by diverse anaerobic bacteria (such as
 368 *G. vaginalis*, *Porphyromonas somerae*, *Corynebacterium urealyticum*, *Dialister spp.*, *Megasphaera*,
 369 *A. vaginae*, *Prevotella disiens*) or *L. iners* are more likely to be infected by bacterial STI agents such
 370 as *Chlamydia trachomatis* (CT), compared to women with a vaginal microbiota dominated by *L.*
 371 *crispatus* (87). Similar bacteria are increased in women suffering from Chlamydiosis or Candidiasis
 372 (*Gardnerella*, *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Megasphaera*, *Roseburia* and *Atopobium*) in addition to
 373 a *Lactobacillus spp.* depletion (88). Moreover, a cohort study of 255 women demonstrated that BV+
 374 women were at increased risk (3.4 times) to acquire *N. gonorrhoea* and CT, compared to women
 375 colonized with hydrogen peroxide producing *Lactobacillus* (31). Interestingly, *N. gonorrhoeae*
 376 asymptomatic patients had more frequently a *Lactobacillus* dominant microbiota and a lower bacterial
 377 diversity compared to symptomatic patients, suggesting a link between symptoms and the vaginal
 378 microbiota (89). Furthermore, women with tubal infertility and CT infection had a vaginal microbiota
 379 dominated by *L. iners* and a decrease of other *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter*,
 380 *Atopobium* and *Streptococcus* along with a decrease of IFN γ and IL-10 (90). In opposition to CT
 381 infected women, *L. iners* was observed to be decreased in *Trichomonas vaginalis* infected women
 382 whereas *Streptococcus agalactiae*, *P. bivia*, *S. sanguinegens* and *Gemella asaccharolytica* were
 383 increased (91). Presence of *P. amnii* and *S. sanguinegens* have been associated with a 2 fold increased
 384 risk for *T. vaginalis* infection (92). Also, the co-occurrence of *Gardnerella*, *Peptoniphilus*, *Dialister*,
 385 *Atopobium*, *Parvimonas* and *Metamycoplasma hominis* in CT positive women may lead to biofilm
 386 formation (93).

387 **3.1.2 Human papilloma virus (HPV) and HIV-1**

388 Microbial variation is detected in women with high risk HPV infection, characterized by a decrease of
 389 *Lactobacillus spp.*, *Veillonella*, *Sneathia*, *Sporolactobacillus* and an increase of *Gardnerella*,
 390 *Prevotella*, *Dialister*, *Slackia*, *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*,
 391 *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Ureaplasma*, *Megasphaera* and *Mycoplasma* (94). In addition,
 392 cervicovaginal swabs of HPV⁺ women exhibit higher levels of biogenic amine and phospholipid
 393 compared to HPV⁻ women (95). In a meta-analysis performed by Tamarelle et al., a vaginal microbiota
 394 dominated by *Lactobacillus* was described to have a protective role against HPV and CT but not against
 395 *N. gonorrhoea* and *M. genitalum* (96). In addition, a higher susceptibility to HPV was determined in
 396 BV+ women (97). HPV infection was shown to reduce innate peptide expression including defense
 397 peptides expressed by the vaginal or uterine epithelium. Moreover, *Lactobacillus* was shown to be able
 398 to degrade and use defense peptide as an amino acid source to survive. Therefore, the authors
 399 hypothesized that HPV infection, by reducing defense peptide availability, lead to a reduction of
 400 *Lactobacillus* and an increase of BV associated bacteria that will promote HPV disease progression
 401 (97). In HPV⁺ women that cleared the infection and had a cervical intraepithelial neoplasia removal,
 402 an increased abundance of *L. crispatus* was observed compared to women with a persistent infection.
 403 Interestingly, *G. vaginalis* was present in all women suffering from persistent infection following
 404 surgical treatment (98). Furthermore, during HPV persistence and post-clearance, *G. vaginalis*

405 abundance was increased and associated with a higher cytokine concentration (99). In the FRESH
 406 cohort, 31 women out of 236 were infected with HIV-1 despite HIV prevention counselling. Women
 407 with a high vaginal microbiota diversity and a low abundance of *Lactobacillus* (CST-IV) had a 4-fold
 408 increased risk for HIV-1 acquisition compared to women with a microbiota dominated by *L. crispatus*
 409 (CST-I). Moreover, the authors observed that none of the women with *L. crispatus* dominated
 410 microbiota acquired HIV-1 (49). In a vaginal mucosal culture model, the cervicovaginal fluids from
 411 women with CST-I inhibited HIV-1 infection of TZM-bl cells or primary human monocyte-derived
 412 macrophages, compared to women with CST-IV. HIV-1 infection was even enhanced when the *in vitro*
 413 model was cultured with vaginal fluids of women with CST-IV containing high abundance of
 414 *Ruminococcaceae spp.*, *S. sanguinegens*, *Atopium vaginae* and *Aerococcus spp.* (100).
 415 Overall, a higher bacterial diversity of the vaginal microbiota, associated with an increase of BV
 416 associated bacteria and a decrease of *Lactobacillus spp.* (except *L. iners*) abundance induce a higher
 417 susceptibility to various viral, bacterial and fungal STI (Figure 2).

418 3.1.3 Co-infections

419 Co-infections within the FRT are frequent; indeed, a pre-existing infection can facilitate the acquisition
 420 of a second STI by modifying the local environment. Numerous epidemiology studies described that
 421 women suffering from an STI such as CT, Human Simplex Virus type 2 (HSV-2), *Neisseria*
 422 *gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, or *Trichomonas vaginalis* have an increased risk of HIV-1
 423 acquisition (101–103). Several mechanisms might be involved within the FRT: for instance, CT
 424 infection may facilitate HIV-1 acquisition thanks to cytokines production, leading to the recruitment
 425 of HIV-1 target cells, higher expression of HIV-1 coreceptors CXCR4 or CCR5, or epithelial cell
 426 disruption allowing HIV-1 cell free virus to cross the epithelial barrier... (104–106). Interestingly,
 427 vaginal microbiota of CT/HPV or HSV-2/HIV-1 co-infected women have an increased bacterial
 428 diversity (107,108). Furthermore, Borgogna et al described a distinct metabolic profile between
 429 uninfected and CT infected or CT/*Mycoplasma genitalium* coinfecting women (32). The interplay
 430 between vaginal microbiota, metabolic signatures and FRT inflammation during an STI needs to be
 431 better addressed in order to understand how those modifications may facilitate the acquisition of a
 432 second STI.

433 3.2 Crosstalk between neutrophils and the microbiota during STI exposition

434 During STI exposition, crosstalk between neutrophils and the microbiota can lead to various outcome
 435 in terms of STI acquisition and disease progression (Figure 2). Hensley-McBain et al. have shown that
 436 neutrophil accumulation in colorectal biopsies of HIV-1 infected ART treated patients is due to an
 437 increase of functional neutrophil survival. The authors observed an altered ratio of
 438 *Lactobacillus/Prevotella* in HIV-1 positive individuals, which correlated with neutrophil survival in
 439 colorectal tissue from the same patient. *In vitro* experiments using blood neutrophils isolated from the
 440 patients and exposed to several bacteria (*Prevotella*, *Bacteroides fragilis*, *Ruminococcus bromii*),
 441 increased neutrophil survival compared to *L. plantarum* and *L. rhamnosus* independently of their HIV-
 442 1 status (109). Neutrophils are known for being involved in protection against various STI. However,
 443 in neutrophils isolated from HIV-1 positive individuals, PRR expression is reduced, and upon TLR
 444 stimulation, neutrophils exhibit a reduced cytokine expression (110). During the chronic phase, a
 445 dysbiosis occurs (characterized by a *Gammaproteobacteria* enrichment and a *Lachnospiraceae/*
 446 *Ruminococcaceae* depletion) (111). The hyporesponsiveness of neutrophils, combined with this
 447 dysbiosis could be involved in disease progression, but usually tissue neutrophils are often poorly
 448 analyzed, and more studies are necessary to fully understand the role of neutrophil at mucosal surfaces
 449 and their association with STI risk disease progression (112).

450 In the FRT, various STI agents induce neutrophil activation and antimicrobial function, including NET
 451 production, which prevents several STI acquisition notably during the early phase of infection (70,113).
 452 However, bacterial STI have also developed mechanisms to counteract neutrophil-mediated immunity.
 453 For example, *N. gonorrhoea* and *C. trachomatis* resists neutrophil cytotoxic activity by several
 454 mechanisms, including inhibition of NET formation (114–116). However, up to date, there is no study
 455 on the impact of the vaginal microbiota composition on neutrophil-mediated immunity during bacterial
 456 STI. Probiotics could help maintaining an environment suitable for a balanced neutrophil recruitment
 457 and antimicrobial functions. For example, *Lactobacillus* have been used in the gut to reduce infection
 458 severity linked to inflammation. Neutrophil accumulation is reduced upon *Lactobacillus* treatment.
 459 Oral administration of *L. plantarum* CIRM653 before *K. pneumoniae* infection in mice, induced an
 460 immunosuppressive Treg response and decreased the number of immune cells (macrophages and
 461 neutrophils) and pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF α) compared to naïve mice (117).
 462 In conclusion, neutrophils are present at steady state in the FRT, but can also be rapidly recruited upon
 463 infection. Thus, they might have various roles in STI acquisition, notably depending on the vaginal
 464 microbiota composition, which is an important modulator of the local inflammation.

465 3.3 Mechanisms of action of the vaginal microbiota

466 *Lactobacillus* have been proposed as probiotic agents to be used against pathogenic microorganisms
 467 in the vagina. They can enter in competition with pathogens for attachment sites on epithelial cells, co-
 468 aggregate with pathogens and produce antimicrobial compounds. Indeed, *Lactobacillus* can produce:
 469 (1) biofilm allowing to mask epithelial cell receptors, adhesion to mucins and epithelial cells (118,119)
 470 (2) lactic acid that inhibits pathogen growth (3) bacteriocins and bacteriostatic agents (Figure 3).
 471 *Lactobacillus* are able to decrease bacterial infection such as CT either by aggregating to extracellular
 472 elementary body (EB), by competition for epithelial cells attachment or through lactic acid production
 473 that inactivate CT (120,121). *L. crispatus* strains seem to have the best anti-CT effect (122). *In vitro*,
 474 *L. crispatus* treatment of a CT infected epithelial cell line (J774) decreased the production of IL-6, IL-
 475 8 and TNF α and induced the production of IL-10 (123). In addition, IL-1 α , IL-1 β and TNF α were
 476 strongly associated with CT infection in women that had a change in microbial communities (19). Pre-
 477 colonisation of epithelial cells with *L. crispatus* or *L. crispatus* enolase/glutamine synthetase decreased
 478 the adhesion and invasion of *N. gonorrhoea* probably by entering in competition for epithelial cell
 479 attachment. In addition, the expression of TNF α and CCL20 was also decreased in the pre-colonisation
 480 model (124). Many *Lactobacillus spp.* were described to be able to inhibit *T. vaginalis* adhesion on
 481 epithelial cells (125). Another anti-CT mechanism could result from a decreased availability of
 482 nutrients (such as glucose) in the environment, thanks to its consumption by *Lactobacillus spp.* (122).
 483 Annelot C. Breedvelt et al. demonstrated that women with a *L. crispatus* dominated microbiota had a
 484 higher level of bacterial IgA coating compared to non-*L. crispatus* dominated microbiota. The authors
 485 suggested that a higher level of unbound bacteria with IgA in non-*L. crispatus* dominated microbiota
 486 might be associated with inflammation, and therefore a higher susceptibility to infection (126).

487 3.3.1 Effect of H₂O₂ on pathogens

488 H₂O₂ was described as a potent antimicrobial factor produced by *Lactobacillus*, however, under the
 489 hypoxic conditions found in the vagina, *Lactobacillus* production of H₂O₂ is undetectable (127,128).
 490 Moreover, physiological concentrations of H₂O₂ are not sufficient to have a bactericidal effect on
 491 pathogens, suggesting that the main antimicrobial agent produced by *Lactobacillus* is lactic acid (128).
 492 A paper has demonstrated different inflammatory properties of *Lactobacillus* depending on if they
 493 were isolated from optimal or non-optimal vaginal microbiota. Indeed, stimulation of a vaginal
 494 epithelial cell line with *Lactobacillus* obtained from women with intermediate flora, or BV, induced
 495 an increased inflammation with higher level of IL-6, IL-8, IL-1 α , CCL3, CCL4 and IL-1RA compared

496 to the ones isolated from optimal microbiota. Interestingly, *Lactobacillus* isolated from women with
 497 non-optimal microbiota also produced less D-lactate and lactic acid, compared to *Lactobacillus*
 498 isolated from women with optimal microbiota. Moreover, *Lactobacillus* cell adhesion was negatively
 499 correlated with cytokine expression. These results suggest that anti-inflammatory properties of
 500 *Lactobacillus* depend greatly on the strain studied (129).

501 3.3.2 Effect of lactic acid on pathogens

502 Vaginal lactic acid exists as D and L-isomers. Epithelial cells can only produce L-lactic acid, *L.*
 503 *crispatus* and *L. gasseri* are able to produce both isomers, *L. jensenii* only produces D-lactic acid and
 504 *L. iners* only produces L-lactic acid (130). Lactic acid production acidifies the vagina, but *in vitro*,
 505 when the pH reaches 3.2-4.8, *Lactobacillus* stop their growth and acid lactic production (131). *L. iners*
 506 colonization has been linked to a higher vaginal pH compared to other species of *Lactobacillus* (132).
 507 Matrix metalloproteinase-8, which is able to degrade the cervical plug, is down regulated by D-lactic
 508 acid trough decrease of extracellular metalloproteinase inducer (EMMPRIN), thus inhibiting pathogen
 509 migration to the uterus (130).

510 Lactic acid has an important antimicrobial effect in the vagina. *L. crispatus* pre-colonisation of porcine
 511 vaginal mucosa model inhibits *N. gonorrhoeae* growth mainly through lactic acid production (133).
 512 HIV-1_{BaL} (R5 tropism) exposed to CVL obtained from women was significantly less infectious in a pH
 513 dependent manner, suggesting the role of lactic acid. Indeed, the authors observed a significant
 514 association between a low HIV-1 infectivity and a high percentage of D- and L-lactic acid, which also
 515 correlated with a high relative abundance of *Lactobacillus spp.* (particularly *L. crispatus*) (134).
 516 Moreover, *in vitro* experiments using cervicovaginal mucus (CVM) collected from women
 517 demonstrated a better HIV-1 trapping for CVM with a high concentration in D-lactic acid. These
 518 mechanisms seem to be mediated through hydrogen bonds between surface carboxyl groups of the
 519 virus and host-derived envelope glycolipids or glycoproteins. Furthermore, CVM that trapped HIV-1
 520 were generally associated with a *L. crispatus* dominant microbiota whereas those that failed to trap
 521 HIV-1 had either a *L. iners* dominant microbiota or a significant abundance of *G. vaginalis* (135,136).
 522 On the contrary, Nahui Palomino et al. have shown that L-lactic acid but not D-lactic acid were the
 523 main contributors for HIV-1 inhibition on cervicovaginal explants. The authors also demonstrated that
 524 *Lactobacillus* were able to bind to HIV-1 virions, thus decreasing HIV-1 infection (137).

525 3.3.3 Effect of bacteriocins on pathogens

526 Bacteriocins are antimicrobial peptides or proteins secreted by some but not all vaginal *Lactobacillus*
 527 strains(138,139). Bacteriocins are divided into two classes: class I bacteriocins (lantibiotics) are
 528 lanthionine-containing peptides, whereas class II bacteriocins do not contain lanthionine (140). Class
 529 I bacteriocins are active through the formation of pores and efflux of small metabolites from sensitive
 530 cells or through enzyme inhibition. The majority of class II bacteriocins are active by inducing
 531 membrane permeabilization and the subsequent leakage of molecules from target bacteria. Bacteriocins
 532 isolated from vaginal *Lactobacilli* were shown to inhibit the growth of various microorganisms
 533 including *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida*
 534 *parapsilosis* or *G. vaginalis* (138,139). Bacteriocins are also active against STI agents such as *N.*
 535 *gonorrhoeae* (141). In a recent study, a *Lactobacillus* strain was even shown to selectively inhibit 100%
 536 of *L. iners* strains tested through two different class IIb bacteriocins: gassericin K7A and gassericin
 537 K7B (142). Among other strains of the vaginal microbiota including *L. crispatus*, *L. jensenii*, and *L.*
 538 *gasseri*, only few of them (<20%) were also inhibited by these bacteriocins. *In vitro* studies showed
 539 that bacteriocin production was not constitutive but only occurred in specific conditions: for example
 540 through co-cultivation with several other Gram-positive strains (143) or during the exponential growth
 541 phase of *Lactobacilli* (144), when bacteriocin production was probably being enhanced by

542 autoinduction (143). The ability of various *Lactobacillus* strains to produce bacteriocins that efficiently
 543 inhibit vaginal pathogens may allow their use as therapeutic agents for the treatment and prevention of
 544 urogenital disorders and could be an alternative to conventional antibiotic therapy (144).

545 **3.3.4 Effect of extracellular vesicles on pathogens**

546 A recent study has linked extracellular vesicles (EV) produced by *Lactobacillus* and protection against
 547 HIV-1. EV are produced by Gram (+) and Gram (-) bacteria. In Gram (-), they have been described to
 548 be produced by the pinching off of the outer membrane of the bacteria. However, the mechanism
 549 implied in EV production in Gram (+) bacteria is not yet determined (145). EV produced by
 550 *Lactobacillus spp.* isolated from women (*L. crispatus* BC3 and *L. gasseri* BC12) inhibit HIV-1
 551 replication in CD4⁺ T cells (MT-4 cells), human tonsillar and cervicovaginal tissues in a dose
 552 dependent manner. No HIV-1 inhibition was observed using EV from *L. crispatus* BC5 and *L. gasseri*
 553 BC13. The inhibition seemed to be mediated by a decrease of viral entry or attachment to the target
 554 cells. Metabolomic and proteomic analysis showed differences in EV composition depending of the
 555 ability to inhibit HIV-1. Indeed, HIV-1 inhibiting EV were associated with more amino acids, and the
 556 expression of several proteins such as enolase and elongation factor Tu. Those proteins were reported
 557 to play a role in adhesion to epithelial cells (146). Interestingly, Paolo E. Costantini et al. described
 558 that other Gram (+) bacteria, such as *S. aureus*, *G. vaginalis*, *E. faecium* and *E. faecalis* were able to
 559 produce EV that protect against HIV-1 infection. The mechanism associated with this protection is
 560 through a steric hindrance of gp120. Moreover, several proteins present on EV surface are involved in
 561 the anti-viral effect (147). This mechanism seems to be not exclusive of *Lactobacillus spp.*, therefore
 562 evaluation and comparison between species/strains need to be addressed to understand if EV produced
 563 by *Lactobacillus spp.* have a better HIV-1 inhibitory effect compared to EV produced by anaerobic
 564 bacteria.

565 **3.3.5 Impact of indole production by the vaginal microbiota during the CT infection**

566 The vaginal microbiota can also impact the pathogenesis of STI infection. For example, upon CT
 567 infection, IFN γ production induces the activation of the enzyme IDO1 which depletes the tryptophan
 568 pool within the epithelial cells into kynurenine. *In vitro*, pretreatment with IFN γ of CT (svD) infected
 569 epithelial cell induces the depletion of the tryptophan pool, leading to no infection of the cells. In this
 570 experimental setting, adding indole in the medium promotes epithelial cells infection with CT 72h post-
 571 infection. Supernatant of indole producing bacteria such as *Prevotella intermedia* and *Prevotella*
 572 *nigrescens* also promotes CT infection in presence of IFN γ (148). Interestingly, *in vitro*, IFN γ induced
 573 a persistent CT phenotype which was described to have a distinct proteome profile compared to EB
 574 and reticulate body (RB) with a high expression of the tryptophan operon TrpA and TrpB (149). These
 575 proteins are essential for tryptophan synthesis using indole produced by anaerobic bacteria present in
 576 the FRT (150). Ratios of kynurenine/tryptophan are higher in vaginal fluids of CT infected women,
 577 and correlated with high abundance of *Streptococcus spp.* and *Peptoniphilus spp.* Moreover, 94% of
 578 the samples of CT infected women exhibited a high abundance of indole producing bacteria such as
 579 *Porphyromonas asacharolytica*, *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*, *E. faecalis*,
 580 *Peptoniphilus harei* and *E. coli* (151). CT can retain a subset of genes involved in tryptophan synthesis
 581 (*trpA*, *trpB* and *trpR* genes) and use them to synthesize tryptophan from indole, leading to CT growth
 582 and infection (152).

583 **3.3.6 Impact of the vaginal microbiota on antiviral drugs**

584 Vaginal microbiota composition has been linked to antiretroviral microbicide gel protection against
 585 HIV-1. Treatment with an antiretroviral (tenofovir, TFV) prior to HIV-1 infection leads to a reduced
 586 efficacy of the antiretroviral in culture colonized by bacteria from vaginal fluids of women with a

587 diverse microbiota (100). In the CAPRISA study, TFV gel reduced HIV-1 incidence by 61% in women
 588 with a vaginal microbiota dominated by *Lactobacillus*, but only by 18% in women with a non-
 589 *Lactobacillus* dominant microbiota. Furthermore, TFV concentration in CVL negatively correlated
 590 with BV associated bacteria such as *G. vaginalis* and *Prevotella*. *G. vaginalis* and to a lesser extend
 591 *Prevotella* species, are able to rapidly metabolized TFV before drug uptake by target cells. The
 592 mechanism involves the production of adenine by cleavage of the side chain component of TFV (oxy-
 593 methylphosphonic acid) (153). A recent study has also described that CVL, collected from women
 594 suffering from BV, were able to degrade TFV and dapirivine (DPV) but not tenofovir alafenamide
 595 (TAF). The authors also demonstrated the importance of *Lactobacillus* in preventing drug degradation
 596 by other species of bacteria, highlighting that microbial communities are critical for TFV and DPV
 597 efficacy (154). Identically, Cheu et al. described that TFV and DPV are metabolized by BV associated
 598 bacteria, whereas TAF is not impacted due to faster internalization in target cells, leading to a lower
 599 sensitivity to *G. vaginalis* mediated degradation of TAF (154). On the contrary, Taneva et al. observed
 600 different results, suggesting a more complex role of the microbiota in the modulation of topical
 601 antiretroviral efficacy. They observed that TFV transport into human cells is decreased at high pH.
 602 Compared to the study of Klatt et al., the authors did not observe any metabolization of TFV by *G.*
 603 *vaginalis*. Nevertheless, they observed adenine production in the culture medium, which is able to
 604 block endocytosis of TFV into human cells, leading to decrease protection against HIV-1. They also
 605 observed that TFV is transported and metabolized by *L. crispatus* but not *L. jensenii* and *L. iners*. The
 606 authors hypothesized that *L. crispatus* could be a reservoir that gradually release TFV into the vagina.
 607 Finally, they observed that the inhibitory effect of the vaginal microbiota was overcome at higher drug
 608 levels, suggesting that a sustained drug delivery could be sufficient to induce protection. However, a
 609 decrease in drug levels might lead to a decreased efficacy of antiretroviral due to adenine and high pH.
 610 The pharmacokinetics of tenofovir deoproxil fumarate and TAF were not impacted by the vaginal
 611 microbiota (155). DPV ring use in adolescents was not associated with cervicovaginal inflammation
 612 or microbiota changes, however, a significant increase in *L. crispatus* and a decrease of *L. iners* were
 613 observed when both arms were combined (placebo ring and DPV ring), suggesting a beneficial effect
 614 of ring use on the microbiota (156). In another study, TFV intravaginal ring in adults was also observed
 615 to have no impact on vaginal microbiota composition. Moreover, the authors described no effect of BV
 616 associated bacteria on TFV availability. The hypothesis was that sustained release of TFV by the ring
 617 is sufficient to abrogate the effect of BV associated bacteria (157). The efficacy of daily oral PrEP for
 618 HIV-1 prevention among women with highly diverse microbiota were not impacted, compared to
 619 women with a *Lactobacillus* dominant microbiota (158).

620 4 Non-human primate (NHP) models to study vaginal inflammation and microbiota in STI

621 Animal models including mice, rat or non-human primates (NHP) have been widely used in biomedical
 622 research including for STI studies. Rodents are particularly used due to their numerous advantages
 623 including a low cost in terms of housing, easy breeding and numerous offsprings at each litter.
 624 Moreover, genetic engineering or microbiota modification can be easily performed in mice models for
 625 instance (159,160). However, substantial differences can be highlighted between the mice models and
 626 humans. Divergence between humans and mice occurs between 65 and 75 million years ago (161,162).
 627 Differences in terms of innate and adaptive immune responses can also be highlighted: the balance of
 628 leukocyte subsets (T and B cells), neutrophils and soluble factor production (cytokines and
 629 chemokines) are different for instance (162,163). Moreover, FRT anatomy as well as hormonal
 630 secretion differ between humans and mice. For instance, the cervical epithelium is different between
 631 the two species (164). Furthermore, several infectious pathogens do not infect or recapitulate human
 632 pathology in mice (165). On the contrary, NHP have been described to be susceptible to wide range of
 633 human pathogens including viral (Simian Immunodeficiency virus, the simian analogue of HIV-1,

634 ZIKA, Ebola, Chikungunya or Influenza) or bacterial infections (Periodontal disease, Tuberculosis,
 635 *Chlamydia trachomatis*) (165–168). They are essential to determine vaccine or drug safety/efficacy,
 636 immune responses against infectious pathogens that induce high mortality and tissue specific immune
 637 responses for instance. The NHP model can be used to study human STI by controlling various
 638 parameters such as the infectious dose, or the time of infection that are more difficult to assess in cohort
 639 studies (Figure 4). It is also possible to study the mechanisms involved during co-infections
 640 establishment, which is much more difficult in cohort studies.

641 4.1 Similarities between Human and NHP

642 Humans and NHP are closely similar since their divergence occurs only between 6 to 7 million years
 643 ago (161). Therefore, it is not surprising to observe similitudes in terms of immune system, female
 644 reproductive tract and to a lower extend vaginal microbiota between the two species. Three species of
 645 macaques are commonly used: rhesus macaque (*Macaca mulatta*), cynomolgus macaque (*Macaca*
 646 *fascicularis*) and pigtail macaque (*Macaca nemestrina*) (169).

647 4.1.1 Immune system

648 Immune cells including neutrophils, basophils, CD8⁺ and CD4⁺ T cells, B cells, NK cells, plasmacytoid
 649 DC, classical/intermediate or non-classical monocytes in the blood are observed in rhesus, cynomolgus
 650 macaques and humans and have similar surface markers (163,170). For example, DC subsets represent
 651 less than 1% of cells in PBMC and express similar TLR in humans and rhesus macaques (RM). Both
 652 species have similar T cell subsets (naïve, central memory or effector memory) (171). However, some
 653 differences can be noticed between NHP and humans. Z.B Bjornson-Hooper et al., observed more
 654 CD4⁺ CD8⁺ double positive T cells, a lower ratio of classical/non classical DC, low expression of
 655 CD11c and CD16 on neutrophils and the CD8 expression on NK cells in the blood of cynomolgus or
 656 rhesus macaques compared to humans (163). The lower presence of B cells is also noticed in peripheral
 657 blood, mesenteric lymph node and spleen in cynomolgus macaques compared to humans (170).

658 4.1.2 Female reproductive tract

659 The female reproductive tract of cynomolgus macaques is closely similar to the one in women in terms
 660 of morphology, endocrine system and menstrual cycle (172). The menstrual cycle in rhesus and
 661 cynomolgus macaques (28-32 days) is similar to the one observed in humans (28-30 days). The
 662 follicular phase lasts 12 to 14 days and the luteal phase around 14 to 16 days (173). Menstruation lasts
 663 between 1 and 8 days, but 85% of the females exhibit a menstruation cycle of only 3 to 5 days (174).
 664 RM exhibit seasonal variations in their sexual and gonadal activity (only active from October to
 665 March), contrary to marmoset and cynomolgus macaques (173).

666 The localization and phenotype of immune cells are similar in the human and cynomolgus macaque
 667 FRT. Marlin et al. have characterized the immune cell proportions in the vagina, cervix, uterus and
 668 fallopian tubes of cynomolgus macaques. T lymphocytes are the main leukocyte population, with a
 669 higher number of CD8⁺ T cells (40% of total leukocytes) compared to CD4⁺ T cells (20% of total
 670 leukocytes in the lower FRT, 10% in the upper tract). Moreover, T cells exhibit a memory phenotype:
 671 CD4⁺ T cells expressed markers of central memory phenotype (CD28⁺/CD95⁺) and CD8⁺ T cells
 672 exhibit a central memory and effector memory phenotype. B lymphocytes represent a minor population
 673 in the FRT. NK cells represent less than 4% of total leukocytes in the FRT, however, this percentage
 674 reaches 15% of total leukocytes in the uterus. Myeloid DC and CD14⁺ cells represent 2.2% and 5.6%
 675 of total leukocytes in the FRT. Those cells were observed in all compartments, but are increased in the
 676 uterus. Finally, neutrophils were mainly observed in the cervix (6.8% of total leukocytes) and in the
 677 upper tract (1.8% and 2.3% of total leukocytes in the uterus and fallopian tubes respectively) (175).

678 These similarities between Humans and macaques allow a better characterization of the genital
 679 inflammation, the environmental factors impacting the inflammation and thus the development of
 680 strategies to modulate this inflammation. Indeed, in cynomolgus macaques, it is possible to test
 681 intervention strategies targeting immune cells or using microbicides to modulate the inflammation.
 682 Moreover, during those studies, it is possible to access various samples in longitudinal studies,
 683 including tissue sample for instance, that can be difficult to obtain in Humans (Figure 4).

684 4.1.3 Vaginal microbiota

685 The vaginal microbiota of macaques exhibits low abundance of *Lactobacillus*, contrary to what is
 686 observed in eubiosis women. Many species of macaques harbor a diverse vaginal microbiota,
 687 composed of a wide range of bacteria including *Saccharofermentans*, *Campylobacter*, *Atopobacter*,
 688 *Thioreductor*, *Streptococcus* and interestingly, several BV associated bacteria such as *Gardnerella*,
 689 *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Sneathia*, *Atopium*, *Peptoniphilus*, *Dialister*, *Mobiluncus* and
 690 *Porphyromonas*. The vaginal pH is also higher than in humans, with a median value of 7 (176–180).
 691 *Lactobacillus* can be found in all species of macaques, but at a low abundance. In RM, most of the
 692 *Lactobacillus* detected are *L. johnsonii*, and few sequences correspond to *L. gasseri* and *L. salivarius*.
 693 A comparative study between humans and RM showed that oral, perianal and vaginal microbiota of
 694 RM were distinct from the human ones. Indeed, the vaginal microbiota was more diverse than the
 695 human vaginal microbiota. The vaginal microbiota of cynomolgus macaques is similar in terms of
 696 taxonomic composition and relative abundance to the one of women harboring a high vaginal
 697 microbiota diversity (CST-IV). It is also variable according to animals and correlates with hormonal
 698 variation during the menstrual cycle (180). The vaginal microbiota is more diverse during lactation and
 699 menstruation (181). More precisely, during the menstruation there is an increased concentration of pro-
 700 inflammatory cytokines, a higher abundance of mature/activated neutrophils that originate from the
 701 blood and vaginal microbiota fluctuation (60)

702 One hypothesis explaining the low abundance of *lactobacillus spp* in macaques concerns the levels of
 703 glycogen and lactic acid poorly present in the vaginal fluids of macaques compared to humans (182).
 704 Indeed, Miller et al. hypothesized that high level of starch in human diets have induced an increased
 705 amount of glycogen within the vagina, which in turn promotes the proliferation of *Lactobacillus* (183).
 706 Several research teams have developed macaque's model vaginally enriched with *Lactobacillus*, but
 707 were only partially successful (184,185). The authors observed either a transient colonization with *L.*
 708 *crispatus* and/or no modification of cervicovaginal inflammation and pH. The diverse vaginal
 709 microbiota in cynomolgus macaques makes it a good model to study dysbiosis: the NHP model can be
 710 used to test various strategies aiming at improving the genital health by modifying the vaginal
 711 microbiota for instance using combinations of antibiotics, prebiotic and/or probiotics (Figure 4).

712 Overall, the NHP model is suitable to study human physiological and pathological situations. It allows
 713 the monitoring of the systemic and local immune responses in the FRT. Various factors impacting the
 714 local inflammation such as cytokine profiles, immune cell distribution, the vaginal microbiota, ongoing
 715 STI ... can also be evaluated individually in this model. It is a relevant model to study the susceptibility
 716 and the response to infectious diseases such as STI. Moreover, the NHP model can be manipulated to
 717 evaluated safety/efficacy of vaccines and therapies against STI or genital inflammation.

718 5 Conclusions:

719 Vaginal microbiota composition is increasingly described to have a central role in the regulation of
 720 FRT inflammation and protection against STI acquisition. However, the mechanisms of action are still
 721 poorly understood. New models, including cervicovaginal 3D model or human vagina on chip, will be
 722 interesting to study how the vaginal microbiota composition, as well as metabolites, regulate the FRT
 723 inflammation (44,186). Furthermore, the use of a suitable animal model that reproduce the FRT

724 environment, including immune cells, soluble factors, vaginal microbiota composition with an
725 environment subject to hormonal fluctuation for instance, is mandatory.
726 In conclusion, this review highlights the interplay between the vaginal microbiota composition and the
727 local inflammation, including cytokine/chemokine production, cell recruitment and especially
728 neutrophil presence in association with susceptibility to STI. Moreover, several mechanisms of action
729 of how an optimal vaginal microbiota is able to decrease the susceptibility and favor the treatment of
730 STI, are discussed. Finally, the NHP model is described demonstrating its usefulness for the study of
731 vaginal microbiota composition and FRT inflammation, including innate and adaptive immune
732 responses in a context or not of STIs.

733 **6 Manuscript Formatting**

734 **6.1 Figures**

735 Frontiers requires figures to be submitted individually, in the same order as they are referred to in the
736 manuscript. Figures will then be automatically embedded at the bottom of the submitted manuscript.
737 Kindly ensure that each table and figure is mentioned in the text and in numerical order. Figures must
738 be of sufficient resolution for publication ([see here for examples and minimum requirements](#)).
739 Figures which are not according to the guidelines will cause substantial delay during the production
740 process. Figure legends should be placed at the end of the manuscript. Please see [here](#) for full Figure
741 guidelines
742

743 **7 Conflict of Interest**

744 *The authors declare the absence of any commercial or financial relationships that could be*
745 *construed as a potential conflict of interest.*

746 **8 Author Contributions**

747 C.A. wrote the first draft of the manuscript, designed the figures and did subsequent edits. L.R.
748 completed the first draft and subsequent edits in the text and the figures. E.M. provided critical
749 feedback and edits on the work throughout. The authors approved the final edit of the manuscript as
750 submitted. All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship.

751 **9 Funding**

752 This work did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-
753 for-profit sectors.

754 **10 Acknowledgments**

755 **11 References**

- 756 1. Iijima N, Thompson J, Iwasaki A. Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract.
757 *Mucosal Immunol* (2008) 1:451–459. doi: 10.1038/mi.2008.57
- 758 2. Petrova MI, van den Broek M, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S. Vaginal microbiota and
759 its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev* (2013) 37:762–792. doi:
760 10.1111/1574-6976.12029
- 761 3. Ramanathan R, Woodrow K. Engineering immunity in the mucosal niche against sexually

- 762 transmitted infections. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* (2016) 8:107–122. doi:
 763 10.1002/wnan.1359
- 764 4. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces
 765 of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the
 766 transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol* (2011) 88:185–194. doi:
 767 10.1016/j.jri.2011.01.005
- 768 5. Kaushic C. HIV-1 infection in the female reproductive tract: role of interactions between HIV-
 769 1 and genital epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* (2011) 65:253–260. doi: 10.1111/j.1600-
 770 0897.2010.00965.x
- 771 6. Andersch-Björkman Y, Thomsson KA, Larsson JMH, Ekerhovd E, Hansson GC. Large Scale
 772 Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the
 773 Menstrual Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics* (2007) 6:708–716. doi: 10.1074/mcp.M600439-
 774 MCP200
- 775 7. Reis Machado J, da Silva MV, Cavellani CL, Antônia dos Reis M, Monteiro MLG dos R,
 776 Teixeira V de PA, Rosa Miranda Corrêa R. Mucosal Immunity in the Female Genital Tract, HIV/AIDS.
 777 *Biomed Res Int* (2014) 2014: doi: 10.1155/2014/350195
- 778 8. Strbo N, Alcaide ML, Romero L, Bolivar H, Jones D, Podack ER, Fischl MA. Loss of
 779 intraepithelial endocervical gamma delta (GD) 1 T cells in HIV infected women. *Am J Reprod Immunol*
 780 (2016) 75:134–145. doi: 10.1111/aji.12458
- 781 9. Gibbs A, Leansyah E, Introini A, Paquin-Proulx D, Hasselrot K, Andersson E, Broliden K,
 782 Sandberg JK, Tjernlund A. MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-
 783 17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation. *Mucosal Immunol* (2017) 10:35–45. doi:
 784 10.1038/mi.2016.30
- 785 10. Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Guyre PM, Wira CR, Gosselin EJ. Flow Cytometric
 786 Analysis of Leukocytes in the Human Female Reproductive Tract: Comparison of Fallopian Tube,
 787 Uterus, Cervix, and Vagina. *American Journal of Reproductive Immunology* (1997) 38:350–359. doi:
 788 10.1111/j.1600-0897.1997.tb00311.x
- 789 11. Benjelloun F, Quillay H, Cannou C, Marlin R, Madec Y, Fernandez H, Chrétien F, Le Grand
 790 R, Barré-Sinoussi F, Nugeyre M-T, et al. Activation of Toll-Like Receptors Differentially Modulates
 791 Inflammation in the Human Reproductive Tract: Preliminary Findings. *Front Immunol* (2020) 11:1655.
 792 doi: 10.3389/fimmu.2020.01655
- 793 12. Trifonova RT, Lieberman J, van Baarle D. Distribution of immune cells in the human cervix
 794 and implications for HIV transmission. *Am J Reprod Immunol* (2014) 71:252–264. doi:
 795 10.1111/aji.12198
- 796 13. Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ. Immunological Microenvironments in the Human Vagina
 797 and Cervix: Mediators of Cellular Immunity Are Concentrated in the Cervical Transformation Zone.
 798 *Biol Reprod* (2005) 73:1253–1263. doi: 10.1095/biolreprod.105.043133
- 799 14. Yeaman GR, Guyre PM, Fanger MW, Collins JE, White HD, Rathbun W, Orndorff KA,
 800 Gonzalez J, Stern JE, Wira CR. Unique CD8+ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine
 801 endometrium. *Journal of Leukocyte Biology* (1997) 61:427–435. doi: 10.1002/jlb.61.4.427
- 802 15. Sullivan DA, Richardson GS, MacLaughlin DT, Wira CR. Variations in the levels of secretory
 803 component in human uterine fluid during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem* (1984) 20:509–513.
 804 doi: 10.1016/0022-4731(84)90263-2
- 805 16. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The role of sex hormones in immune protection of
 806 the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:217–230. doi: 10.1038/nri3819
- 807 17. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R,
 808 Russell J, Tacket CO, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA*
 809 (2011) 108 Suppl 1:4680–4687. doi: 10.1073/pnas.1002611107
- 810 18. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UME, Zhong X, Koenig SSK, Fu L, Ma

- 811 ZS, Zhou X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* (2012)
812 4:132ra52. doi: 10.1126/scitranslmed.3003605
- 813 19. Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, Bowman BA, Yamamoto HS, Soumillon M, Padavattan
814 N, Ismail N, Moodley A, Sabatini ME, et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host
815 inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity* (2015) 42:965–976. doi:
816 10.1016/j.immuni.2015.04.019
- 817 20. Kumar M, Murugesan S, Singh P, Saadaoui M, Elhag DA, Terranegra A, Kabeer BSA, Marr
818 AK, Kino T, Brummaier T, et al. Vaginal Microbiota and Cytokine Levels Predict Preterm Delivery in
819 Asian Women. *Front Cell Infect Microbiol* (2021) 11:639665. doi: 10.3389/fcimb.2021.639665
- 820 21. Srinivasan S, Morgan MT, Fiedler TL, Djukovic D, Hoffman NG, Raftery D, Marrazzo JM,
821 Fredricks DN. Metabolic Signatures of Bacterial Vaginosis. *mBio* (2015) 6: doi: 10.1128/mBio.00204-
822 15
- 823 22. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with
824 bacterial vaginosis. *N Engl J Med* (2005) 353:1899–1911. doi: 10.1056/NEJMoa043802
- 825 23. Criswell BS, Ladwig CL, Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis*: vaginitis by
826 inoculation from culture. *Obstet Gynecol* (1969) 33:195–199.
- 827 24. Muzny CA, Łaniewski P, Schwebke JR, Herbst-Kralovetz MM. Host-Vaginal Microbiota
828 Interactions in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *Curr Opin Infect Dis* (2020) 33:59–65. doi:
829 10.1097/QCO.0000000000000620
- 830 25. Mirmonsef P, Hotton AL, Gilbert D, Gioia CJ, Maric D, Hope TJ, Landay AL, Spear GT.
831 Glycogen Levels in Undiluted Genital Fluid and Their Relationship to Vaginal pH, Estrogen, and
832 Progesterone. *PLoS ONE* (2016) 11:e0153553. doi: 10.1371/journal.pone.0153553
- 833 26. Brooks JP, Edwards DJ, Blithe DL, Fettweis JM, Serrano MG, Sheth NU, Strauss JF, Buck
834 GA, Jefferson KK. Effects of Combined Oral Contraceptives, Depot Medroxyprogesterone Acetate,
835 and the Levonorgestrel-releasing Intrauterine System on the Vaginal Microbiome. *Contraception*
836 (2017) 95:405–413. doi: 10.1016/j.contraception.2016.11.006
- 837 27. Balle C, Konstantinus IN, Jaumdally SZ, Havyarimana E, Lennard K, Esra R, Barnabas SL,
838 Happel A-U, Moodie Z, Gill K, et al. Hormonal contraception alters vaginal microbiota and cytokines
839 in South African adolescents in a randomized trial. *Nat Commun* (2020) 11: doi: 10.1038/s41467-020-
840 19382-9
- 841 28. Schwebke JR. New concepts in the etiology of bacterial vaginosis. *Curr Infect Dis Rep* (2009)
842 11:143–147. doi: 10.1007/s11908-009-0021-7
- 843 29. Alcaide ML, Rodriguez VJ, Brown MR, Pallikkuth S, Arheart K, Martinez O, Roach M,
844 Fichorova RN, Jones DL, Pahwa S, et al. High Levels of Inflammatory Cytokines in the Reproductive
845 Tract of Women with BV and Engaging in Intravaginal Douching: A Cross-Sectional Study of
846 Participants in the Women Interagency HIV Study. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2017) 33:309–317.
847 doi: 10.1089/aid.2016.0187
- 848 30. Mehta SD, Agingu W, Nordgren RK, Green SJ, Bhaumik DK, Bailey RC, Otieno F.
849 Characteristics of Women and Their Male Sex Partners Predict Bacterial Vaginosis Among a
850 Prospective Cohort of Kenyan Women With Nonoptimal Vaginal Microbiota. *Sex Transm Dis* (2020)
851 47:840–850. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001259
- 852 31. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial Vaginosis Is a Strong
853 Predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* Infection. *Clinical Infectious Diseases*
854 (2003) 36:663–668. doi: 10.1086/367658
- 855 32. Borgogna J-LC, Shardell MD, Yeoman CJ, Ghanem KG, Kadriu H, Ulanov AV, Gaydos CA,
856 Hardick J, Robinson CK, Bavoi PM, et al. The association of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*
857 *genitalium* infection with the vaginal metabolome. *Sci Rep* (2020) 10: doi: 10.1038/s41598-020-60179-
858 z
- 859 33. Kroon SJ, Ravel J, Huston WM. Cervicovaginal microbiota, women’s health, and reproductive

- 860 outcomes. *Fertility and Sterility* (2018) 110:327–336. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.036
- 861 34. Carda-Diéguez M, Cárdenas N, Aparicio M, Beltrán D, Rodríguez JM, Mira A. Variations in
862 Vaginal, Penile, and Oral Microbiota After Sexual Intercourse: A Case Report. *Front Med* (2019)
863 6:178. doi: 10.3389/fmed.2019.00178
- 864 35. Balle C, Esra R, Havyarimana E, Jaumdally SZ, Lennard K, Konstantinus IN, Barnabas SL,
865 Happel A-U, Gill K, Pidwell T, et al. Relationship between the Oral and Vaginal Microbiota of South
866 African Adolescents with High Prevalence of Bacterial Vaginosis. *Microorganisms* (2020) 8: doi:
867 10.3390/microorganisms8071004
- 868 36. Song SD, Acharya KD, Zhu JE, Deveney CM, Walther-Antonio MRS, Tetel MJ, Chia N. Daily
869 Vaginal Microbiota Fluctuations Associated with Natural Hormonal Cycle, Contraceptives, Diet, and
870 Exercise. *mSphere* (2020) 5: doi: 10.1128/mSphere.00593-20
- 871 37. Brotman RM, He X, Gajer P, Fadrosch D, Sharma E, Mongodin EF, Ravel J, Glover ED, Rath
872 JM. Association between cigarette smoking and the vaginal microbiota: a pilot study. *BMC Infect Dis*
873 (2014) 14:471. doi: 10.1186/1471-2334-14-471
- 874 38. Amabebe E, Anumba DOC. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of
875 Lactobacilli. *Front Med (Lausanne)* (2018) 5: doi: 10.3389/fmed.2018.00181
- 876 39. Lennard K, Dabee S, Barnabas SL, Havyarimana E, Blakney A, Jaumdally SZ, Botha G,
877 Mkhize NN, Bekker L-G, Lewis DA, et al. Microbial Composition Predicts Genital Tract Inflammation
878 and Persistent Bacterial Vaginosis in South African Adolescent Females. *Infect Immun* (2018) 86: doi:
879 10.1128/IAI.00410-17
- 880 40. Masson L, Barnabas S, Deese J, Lennard K, Dabee S, Gamielien H, Jaumdally SZ, Williamson
881 A-L, Little F, Van Damme L, et al. Inflammatory cytokine biomarkers of asymptomatic sexually
882 transmitted infections and vaginal dysbiosis: a multicentre validation study. *Sex Transm Infect* (2019)
883 95:5–12. doi: 10.1136/sextrans-2017-053506
- 884 41. Jaspers V, Kyongo J, Joseph S, Hardy L, Cools P, Crucitti T, Mwaura M, Ndayisaba G, Delany-
885 Moretlwe S, Buyze J, et al. A longitudinal analysis of the vaginal microbiota and vaginal immune
886 mediators in women from sub-Saharan Africa. *Sci Rep* (2017) 7:11974. doi: 10.1038/s41598-017-
887 12198-6
- 888 42. Gautam R, Borgdorff H, Jaspers V, Francis SC, Verhelst R, Mwaura M, Delany-Moretlwe S,
889 Ndayisaba G, Kyongo JK, Hardy L, et al. Correlates of the molecular vaginal microbiota composition
890 of African women. *BMC Infect Dis* (2015) 15: doi: 10.1186/s12879-015-0831-1
- 891 43. Eade CR, Diaz C, Wood MP, Anastos K, Patterson BK, Gupta P, Cole AL, Cole AM.
892 Identification and Characterization of Bacterial Vaginosis-Associated Pathogens Using a
893 Comprehensive Cervical-Vaginal Epithelial Coculture Assay. *PLoS One* (2012) 7: doi:
894 10.1371/journal.pone.0050106
- 895 44. Łaniewski P, Herbst-Kralovetz MM. Bacterial vaginosis and health-associated bacteria
896 modulate the immunometabolic landscape in 3D model of human cervix. *npj Biofilms Microbiomes*
897 (2021) 7:88. doi: 10.1038/s41522-021-00259-8
- 898 45. Borgdorff H, Gautam R, Armstrong SD, Xia D, Ndayisaba GF, van Teijlingen NH, Geijtenbeek
899 TBH, Wastling JM, van de Wijgert JHHM. Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with
900 proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier. *Mucosal Immunol*
901 (2016) 9:621–633. doi: 10.1038/mi.2015.86
- 902 46. Delgado-Diaz DJ, Tyssen D, Hayward JA, Gugasyan R, Hearps AC, Tachedjian G. Distinct
903 Immune Responses Elicited From Cervicovaginal Epithelial Cells by Lactic Acid and Short Chain
904 Fatty Acids Associated With Optimal and Non-optimal Vaginal Microbiota. *Front Cell Infect*
905 *Microbiol* (2020) 9: doi: 10.3389/fcimb.2019.00446
- 906 47. Jang S-E, Jeong J-J, Choi S-Y, Kim H, Han MJ, Kim D-H. Lactobacillus rhamnosus HN001
907 and Lactobacillus acidophilus La-14 Attenuate Gardnerella vaginalis-Infected Bacterial Vaginosis in
908 Mice. *Nutrients* (2017) 9: doi: 10.3390/nu9060531

- 909 48. Nicolò S, Tanturli M, Mattiuz G, Antonelli A, Baccani I, Bonaiuto C, Baldi S, Nannini G,
 910 Menicatti M, Bartolucci G, et al. Vaginal Lactobacilli and Vaginal Dysbiosis-Associated Bacteria
 911 Differently Affect Cervical Epithelial and Immune Homeostasis and Anti-Viral Defenses. *IJMS* (2021)
 912 22:6487. doi: 10.3390/ijms22126487
- 913 49. Gosmann C, Anahtar MN, Handley SA, Farcasanu M, Abu-Ali G, Bowman BA, Padavattan N,
 914 Desai C, Droit L, Moodley A, et al. Lactobacillus-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities are
 915 Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women. *Immunity* (2017) 46:29–
 916 37. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.013
- 917 50. Ssemaganda A, Cholette F, Perner M, Kambaran C, Adhiambo W, Wambugu PM, Gebrebrhan
 918 H, Lee A, Nuhu F, Mwatelah RS, et al. Endocervical Regulatory T Cells Are Associated With
 919 Decreased Genital Inflammation and Lower HIV Target Cell Abundance. *Front Immunol* (2021)
 920 12:726472. doi: 10.3389/fimmu.2021.726472
- 921 51. Munusamy Ponnas S, Thiruvengadam K, Tellapragada C, Ambikan AT, Narayanan A,
 922 Kathirvel S, Mathayan M, Shankar J, Rajaraman A, Afshan Amanulla M, et al. Deciphering the Role
 923 of Mucosal Immune Responses and the Cervicovaginal Microbiome in Resistance to HIV Infection in
 924 HIV-Exposed Seronegative (HESN) Women. *Microbiol Spectr* (2021) 9:e00470-21. doi:
 925 10.1128/Spectrum.00470-21
- 926 52. Byrne EH, Farcasanu M, Bloom SM, Xulu N, Xu J, Hykes BL, Mafunda NA, Hayward MR,
 927 Dong M, Dong KL, et al. Antigen Presenting Cells Link the Female Genital Tract Microbiome to
 928 Mucosal Inflammation, With Hormonal Contraception as an Additional Modulator of Inflammatory
 929 Signatures. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (2021) 11:882. doi:
 930 10.3389/fcimb.2021.733619
- 931 53. Thurman AR, Kimble T, Herold B, Mesquita PMM, Fichorova RN, Dawood HY, Fashemi T,
 932 Chandra N, Rabe L, Cunningham TD, et al. Bacterial Vaginosis and Subclinical Markers of Genital
 933 Tract Inflammation and Mucosal Immunity. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2015) 31:1139–1152. doi:
 934 10.1089/aid.2015.0006
- 935 54. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female
 936 genital tract: cellular responses and interactions. *Immunological Reviews* (2005) 206:306–335. doi:
 937 10.1111/j.0105-2896.2005.00287.x
- 938 55. Smith JM, Wira CR, Fanger MW, Shen L. Human Fallopian Tube Neutrophils – A Distinct
 939 Phenotype from Blood Neutrophils. *American Journal of Reproductive Immunology* (2006) 56:218–
 940 229. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00410.x
- 941 56. Lasarte S, Samaniego R, Salinas-Muñoz L, Guia-Gonzalez MA, Weiss LA, Mercader E,
 942 Ceballos-García E, Navarro-González T, Moreno-Ochoa L, Perez-Millan F, et al. Sex Hormones
 943 Coordinate Neutrophil Immunity in the Vagina by Controlling Chemokine Gradients. *J Infect Dis*
 944 (2016) 213:476–484. doi: 10.1093/infdis/jiv402
- 945 57. Godaly G, Proudfoot AE, Offord RE, Svanborg C, Agace WW. Role of epithelial interleukin-
 946 8 (IL-8) and neutrophil IL-8 receptor A in Escherichia coli-induced transuroepithelial neutrophil
 947 migration. *Infect Immun* (1997) 65:3451–3456. doi: 10.1128/iai.65.8.3451-3456.1997
- 948 58. Sasaki S, Nagata K, Kobayashi Y. Regulation of the estrous cycle by neutrophil infiltration into
 949 the vagina. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2009) 382:35–40. doi:
 950 10.1016/j.bbrc.2009.02.112
- 951 59. Salinas-Muñoz L, Campos-Fernández R, Mercader E, Olivera-Valle I, Fernández-Pacheco C,
 952 Matilla L, García-Bordas J, Brazil JC, Parkos CA, Asensio F, et al. Estrogen Receptor-Alpha (ESR1)
 953 Governs the Lower Female Reproductive Tract Vulnerability to *Candida albicans*. *Frontiers in*
 954 *Immunology* (2018) 9:1033. doi: 10.3389/fimmu.2018.01033
- 955 60. Adapen C, Réot L, Nunez N, Cannou C, Marlin R, Lemaître J, d’Agata L, Gilson E, Ginoux E,
 956 Le Grand R, et al. Local Innate Markers and Vaginal Microbiota Composition Are Influenced by
 957 Hormonal Cycle Phases. *Front Immunol* (2022) 13:841723. doi: 10.3389/fimmu.2022.841723

- 958 61. Zhang D, Frenette PS. Cross talk between neutrophils and the microbiota. *Blood* (2019)
959 133:2168–2177. doi: 10.1182/blood-2018-11-844555
- 960 62. Mohammadi A, Bagherichimeh S, Perry MC, Fazel A, Tevlin E, Huibner S, Tharao W, Coburn
961 B, Kaul R. The impact of cervical cytobrush sampling on cervico-vaginal immune parameters and
962 microbiota relevant to HIV susceptibility. *Sci Rep* (2020) 10: doi: 10.1038/s41598-020-65544-6
- 963 63. Cauci S. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal
964 fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Molecular Human Reproduction* (2003) 9:53–
965 58. doi: 10.1093/molehr/gag003
- 966 64. Chen Q, Wang S, Guo J, Xie Q, Evivie SE, Song Y, Li B, Huo G. The Protective Effects of
967 *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0344 on LPS-Induced Mastitis In Vitro and In Vivo. *Front Immunol*
968 (2021) 12:770822. doi: 10.3389/fimmu.2021.770822
- 969 65. Michels M, Jesus GFA, Voytena APL, Rossetto M, Ramlov F, Córneo E, Feuser P, Gelain D,
970 Dal-Pizzol F. Immunomodulatory Effect of Bifidobacterium, Lactobacillus, and Streptococcus Strains
971 of Paraprobiotics in Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammatory Responses in RAW-264.7
972 Macrophages. *Curr Microbiol* (2022) 79:9. doi: 10.1007/s00284-021-02708-1
- 973 66. Molloy MJ, Grainger JR, Bouladoux N, Hand TW, Koo LY, Naik S, Quinones M, Dzutsev AK,
974 Gao J-L, Trinchieri G, et al. Intraluminal Containment of Commensal Outgrowth in the Gut during
975 Infection-Induced Dysbiosis. *Cell Host & Microbe* (2013) 14:318–328. doi:
976 10.1016/j.chom.2013.08.003
- 977 67. Vogt KL, Summers C, Chilvers ER, Condliffe AM. Priming and de-priming of neutrophil
978 responses in vitro and in vivo. *Eur J Clin Invest* (2018) 48:e12967. doi: 10.1111/eci.12967
- 979 68. Cassatella MA, Östberg NK, Tamassia N, Soehnlein O. Biological Roles of Neutrophil-Derived
980 Granule Proteins and Cytokines. *Trends in Immunology* (2019) 40:648–664. doi:
981 10.1016/j.it.2019.05.003
- 982 69. Yoshimura T, McLean MH, Dzutsev AK, Yao X, Chen K, Huang J, Gong W, Zhou J, Xiang
983 Y, H Badger J, et al. The Antimicrobial Peptide CRAMP Is Essential for Colon Homeostasis by
984 Maintaining Microbiota Balance. *J Immunol* (2018) 200:2174–2185. doi: 10.4049/jimmunol.1602073
- 985 70. Barr FD, Ochsenbauer C, Wira CR, Rodriguez-Garcia M. Neutrophil extracellular traps prevent
986 HIV infection in the female genital tract. *Mucosal Immunol* (2018) 11:1420–1428. doi:
987 10.1038/s41385-018-0045-0
- 988 71. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function.
989 *Annu Rev Biochem* (2016) 85:765–792. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014442
- 990 72. Hahn S, Giaglis S, Chowdury CS, Höfli I, Hasler P. Modulation of neutrophil NETosis:
991 interplay between infectious agents and underlying host physiology. *Semin Immunopathol* (2013)
992 35:439–453. doi: 10.1007/s00281-013-0380-x
- 993 73. Bornhöfft KF, Rebl A, Gallagher ME, Viergutz T, Zlatina K, Reid C, Galuska SP. Sialylated
994 Cervical Mucins Inhibit the Activation of Neutrophils to Form Neutrophil Extracellular Traps in
995 Bovine in vitro Model. *Front Immunol* (2019) 10:2478. doi: 10.3389/fimmu.2019.02478
- 996 74. Lewis WG, Robinson LS, Gilbert NM, Perry JC, Lewis AL. Degradation, Foraging, and
997 Depletion of Mucus Sialoglycans by the Vagina-adapted Actinobacterium *Gardnerella vaginalis*.
998 *Journal of Biological Chemistry* (2013) 288:12067–12079. doi: 10.1074/jbc.M113.453654
- 999 75. Deshmukh HS, Liu Y, Menkiti OR, Mei J, Dai N, O’Leary CE, Oliver PM, Kolls JK, Weiser
1000 JN, Worthen GS. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia*
1001 *coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med* (2014) 20:524–530. doi: 10.1038/nm.3542
- 1002 76. Schluter J, Peled JU, Taylor BP, Markey KA, Smith M, Taur Y, Niehus R, Staffas A, Dai A,
1003 Fontana E, et al. The gut microbiota is associated with immune cell dynamics in humans. *Nature* (2020)
1004 588:303–307. doi: 10.1038/s41586-020-2971-8
- 1005 77. Mtshali A, San JE, Osman F, Garrett N, Balle C, Giandhari J, Onywera H, Mngomezulu K,
1006 Mzobe G, de Oliveira T, et al. Temporal Changes in Vaginal Microbiota and Genital Tract Cytokines

- 1007 Among South African Women Treated for Bacterial Vaginosis. *Front Immunol* (2021) 12:730986. doi:
 1008 10.3389/fimmu.2021.730986
- 1009 78. Fagundes CT, Amaral FA, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira
 1010 MM, Souza DG. Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control
 1011 pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J Immunol* (2012) 188:1411–1420. doi:
 1012 10.4049/jimmunol.1101682
- 1013 79. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, Burk RD, Kunisaki Y, Jang J-E,
 1014 Scheiermann C, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* (2015) 525:528–532.
 1015 doi: 10.1038/nature15367
- 1016 80. Wang Y, Gu Y, Fang K, Mao K, Dou J, Fan H, Zhou C, Wang H. Lactobacillus acidophilus
 1017 and Clostridium butyricum ameliorate colitis in murine by strengthening the gut barrier function and
 1018 decreasing inflammatory factors. *Benef Microbes* (2018) 9:775–787. doi: 10.3920/BM2017.0035
- 1019 81. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, Leiner I, Li MO, Frenette
 1020 PS, Pamer EG. Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration
 1021 in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands. *Immunity* (2011) 34:590–601. doi:
 1022 10.1016/j.immuni.2011.02.016
- 1023 82. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Hebeda CB, Farsky SHP, Curi R. Short-chain fatty
 1024 acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clinical Science* (2009) 117:331–
 1025 338. doi: 10.1042/CS20080642
- 1026 83. Ohkubo T, Tsuda M, Tamura M, Yamamura M. SHORT PAPER.: Impaired Superoxide
 1027 Production in Peripheral Blood Neutrophils of Germ-Free Rats. *Scand J Immunol* (1990) 32:727–729.
 1028 doi: 10.1111/j.1365-3083.1990.tb03216.x
- 1029 84. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan
 1030 from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* (2010) 16:228–231. doi:
 1031 10.1038/nm.2087
- 1032 85. Li G, Lin J, Zhang C, Gao H, Lu H, Gao X, Zhu R, Li Z, Li M, Liu Z. Microbiota metabolite
 1033 butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel
 1034 disease. *Gut Microbes* (2021) 13:1968257. doi: 10.1080/19490976.2021.1968257
- 1035 86. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of
 1036 short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem*
 1037 (2011) 22:849–855. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.009
- 1038 87. Balle C, Lennard K, Dabee S, Barnabas SL, Jaumdally SZ, Gasper MA, Maseko V, Mbulawa
 1039 ZZA, Williamson A-L, Bekker L-G, et al. Endocervical and vaginal microbiota in South African
 1040 adolescents with asymptomatic Chlamydia trachomatis infection. *Sci Rep* (2018) 8: doi:
 1041 10.1038/s41598-018-29320-x
- 1042 88. Ceccarani C, Foschi C, Parolin C, D’Antuono A, Gaspari V, Consolandi C, Laghi L, Camboni
 1043 T, Vitali B, Severgnini M, et al. Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital
 1044 infections. *Sci Rep* (2019) 9:14095. doi: 10.1038/s41598-019-50410-x
- 1045 89. Lovett A, Seña AC, Macintyre AN, Sempowski GD, Duncan JA, Waltmann A. Cervicovaginal
 1046 Microbiota Predicts Neisseria gonorrhoeae Clinical Presentation. *Front Microbiol* (2022) 12:790531.
 1047 doi: 10.3389/fmicb.2021.790531
- 1048 90. Chen H, Wang L, Zhao L, Luo L, Min S, Wen Y, Lei W, Shu M, Li Z. Alterations of Vaginal
 1049 Microbiota in Women With Infertility and Chlamydia trachomatis Infection. *Front Cell Infect*
 1050 *Microbiol* (2021) 11:698840. doi: 10.3389/fcimb.2021.698840
- 1051 91. Chiu S-F, Huang P-J, Cheng W-H, Huang C-Y, Chu LJ, Lee C-C, Lin H-C, Chen L-C, Lin W-
 1052 N, Tsao C-H, et al. Vaginal Microbiota of the Sexually Transmitted Infections Caused by Chlamydia
 1053 trachomatis and Trichomonas vaginalis in Women with Vaginitis in Taiwan. *Microorganisms* (2021)
 1054 9:1864. doi: 10.3390/microorganisms9091864
- 1055 92. Jarrett OD, Srinivasan S, Richardson BA, Fiedler T, Wallis JM, Kinuthia J, Jaoko W,

- 1056 Mandaliya K, Fredricks DN, McClelland RS. Specific Vaginal Bacteria Are Associated With an
 1057 Increased Risk of *Trichomonas vaginalis* Acquisition in Women. *The Journal of Infectious Diseases*
 1058 (2019) 220:1503–1510. doi: 10.1093/infdis/jiz354
- 1059 93. Raimondi S, Candeliere F, Amaretti A, Foschi C, Morselli S, Gaspari V, Rossi M, Marangoni
 1060 A. Vaginal and Anal Microbiome during *Chlamydia trachomatis* Infections. *Pathogens* (2021)
 1061 10:1347. doi: 10.3390/pathogens10101347
- 1062 94. Wei Z-T, Chen H-L, Wang C-F, Yang G-L, Han S-M, Zhang S-L. Depiction of Vaginal
 1063 Microbiota in Women With High-Risk Human Papillomavirus Infection. *Front Public Health* (2021)
 1064 8:587298. doi: 10.3389/fpubh.2020.587298
- 1065 95. Borgogna J, Shardell M, Santori E, Nelson T, Rath J, Glover E, Ravel J, Gravitt P, Yeoman C,
 1066 Brotman R. The vaginal metabolome and microbiota of cervical HPV-positive and HPV-negative
 1067 women: a cross-sectional analysis. *BJOG: Int J Obstet Gy* (2020) 127:182–192. doi: 10.1111/1471-
 1068 0528.15981
- 1069 96. Tamarelle J, Thiébaud ACM, de Barbeyrac B, Bébéar C, Ravel J, Delarocque-Astagneau E. The
 1070 vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria*
 1071 *gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clinical*
 1072 *Microbiology and Infection* (2019) 25:35–47. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.019
- 1073 97. Lebeau A, Bruyere D, Roncarati P, Peixoto P, Hervouet E, Cobraiville G, Taminiau B, Masson
 1074 M, Gallego C, Mazzucchelli G, et al. HPV infection alters vaginal microbiome through down-
 1075 regulating host mucosal innate peptides used by *Lactobacilli* as amino acid sources. *Nat Commun*
 1076 (2022) 13:1076. doi: 10.1038/s41467-022-28724-8
- 1077 98. Caselli E, D’Accolti M, Santi E, Soffritti I, Conzadori S, Mazzacane S, Greco P, Contini C,
 1078 Bonaccorsi G. Vaginal Microbiota and Cytokine Microenvironment in HPV Clearance/Persistence in
 1079 Women Surgically Treated for Cervical Intraepithelial Neoplasia: An Observational Prospective Study.
 1080 *Front Cell Infect Microbiol* (2020) 10:540900. doi: 10.3389/fcimb.2020.540900
- 1081 99. Moscicki A-B, Shi B, Huang H, Barnard E, Li H. Cervical-Vaginal Microbiome and Associated
 1082 Cytokine Profiles in a Prospective Study of HPV 16 Acquisition, Persistence, and Clearance. *Front*
 1083 *Cell Infect Microbiol* (2020) 10:569022. doi: 10.3389/fcimb.2020.569022
- 1084 100. Pyles RB, Vincent KL, Baum MM, Elsom B, Miller AL, Maxwell C, Eaves-Pyles TD, Li G,
 1085 Popov VL, Nusbaum RJ, et al. Cultivated Vaginal Microbiomes Alter HIV-1 Infection and
 1086 Antiretroviral Efficacy in Colonized Epithelial Multilayer Cultures. *PLoS One* (2014) 9: doi:
 1087 10.1371/journal.pone.0093419
- 1088 101. Ghys PD, Fransen K, Diallo MO, Ettiègne-Traoré V, Coulibaly IM, Yeboué KM, Kalish ML,
 1089 Maurice C, Whitaker JP, Greenberg AE, et al. The associations between cervicovaginal HIV shedding,
 1090 sexually transmitted diseases and immunosuppression in female sex workers in Abidjan, Côte d’Ivoire.
 1091 *AIDS* (1997) 11:F85-93. doi: 10.1097/00002030-199712000-00001
- 1092 102. Venkatesh KK, van der Straten A, Cheng H, Montgomery ET, Lurie MN, Chipato T, Ramjee
 1093 G, Blanchard K, Padian NS, Mayer KH, et al. The relative contribution of viral and bacterial sexually
 1094 transmitted infections on HIV acquisition in southern African women in the Methods for Improving
 1095 Reproductive Health in Africa study. *Int J STD AIDS* (2011) 22:218–224. doi:
 1096 10.1258/ijsa.2010.010385
- 1097 103. Peterman TA, Newman DR, Maddox L, Schmitt K, Shiver S. Risk for HIV following a
 1098 diagnosis of syphilis, gonorrhoea or chlamydia: 328,456 women in Florida, 2000–2011. *Int J STD*
 1099 *AIDS* (2015) 26:113–119. doi: 10.1177/0956462414531243
- 1100 104. Sperling R, Kraus TA, Ding J, Veretennikova A, Lorde-Rollins E, Singh T, Lo Y, Quayle AJ,
 1101 Chang TL. Differential profiles of immune mediators and in vitro HIV infectivity between endocervical
 1102 and vaginal secretions from women with *Chlamydia trachomatis* infection: A pilot study. *J Reprod*
 1103 *Immunol* (2013) 99: doi: 10.1016/j.jri.2013.07.003
- 1104 105. Schust DJ, Ibana JA, Buckner LR, Ficarra M, Sugimoto J, Amedee AM, Quayle AJ. Potential

- 1105 mechanisms for increased HIV-1 transmission across the endocervical epithelium during C.
 1106 trachomatis infection. *Curr HIV Res* (2012) 10:218–227.
- 1107 106. Kelly KA, Walker JC, Jameel SH, Gray HL, Rank RG. Differential Regulation of CD4
 1108 Lymphocyte Recruitment between the Upper and Lower Regions of the Genital Tract during
 1109 Chlamydia trachomatis Infection. *Infect Immun* (2000) 68:1519–1528.
- 1110 107. Keller MJ, Huber A, Espinoza L, Serrano MG, Parikh HI, Buck GA, Gold JA, Wu Y, Wang T,
 1111 Herold BC. Impact of Herpes Simplex Virus Type 2 and Human Immunodeficiency Virus Dual
 1112 Infection on Female Genital Tract Mucosal Immunity and the Vaginal Microbiome. *The Journal of*
 1113 *Infectious Diseases* (2019) 220:852–861. doi: 10.1093/infdis/jiz203
- 1114 108. Marisa Di Pietro, Simone Filardo, Maria Grazia Porpora, Nadia Recine, Maria Agnese Latino,
 1115 Rosa Sessa. HPV/Chlamydia trachomatis co-infection: metagenomic analysis of cervical microbiota
 1116 in asymptomatic women. *New microbiologica* (2018)
- 1117 109. Hensley-McBain T, Wu MC, Manuzak JA, Cheu RK, Gustin A, Driscoll CB, Zevin AS, Miller
 1118 CJ, Coronado E, Smith E, et al. Increased mucosal neutrophil survival is associated with altered
 1119 microbiota in HIV infection. *PLoS Pathog* (2019) 15:e1007672. doi: 10.1371/journal.ppat.1007672
- 1120 110. Hernandez JC, Giraldo DM, Paul S, Urcuqui-Inchima S. Involvement of Neutrophil
 1121 Hyporesponse and the Role of Toll-Like Receptors in Human Immunodeficiency Virus 1 Protection.
 1122 *PLOS ONE* (2015) 10:e0119844. doi: 10.1371/journal.pone.0119844
- 1123 111. Vujkovic-Cvijin I, Sortino O, Verheij E, Sklar J, Wit FW, Kootstra NA, Sellers B, Brenchley
 1124 JM, Ananworanich J, Loeff MS van der, et al. HIV-associated gut dysbiosis is independent of sexual
 1125 practice and correlates with noncommunicable diseases. *Nat Commun* (2020) 11:2448. doi:
 1126 10.1038/s41467-020-16222-8
- 1127 112. Hensley-McBain T, Klatt NR. The Dual Role of Neutrophils in HIV Infection. *Curr HIV/AIDS*
 1128 *Rep* (2018) 15:1–10. doi: 10.1007/s11904-018-0370-7
- 1129 113. Lehr S, Vier J, Häcker G, Kirschnek S. Activation of neutrophils by Chlamydia trachomatis-
 1130 infected epithelial cells is modulated by the chlamydial plasmid. *Microbes and Infection* (2018)
 1131 20:284–292. doi: 10.1016/j.micinf.2018.02.007
- 1132 114. Jean S, Juneau RA, Criss AK, Cornelissen CN. Neisseria gonorrhoeae Evades Calprotectin-
 1133 Mediated Nutritional Immunity and Survives Neutrophil Extracellular Traps by Production of TdfH.
 1134 *Infect Immun* (2016) 84:2982–2994. doi: 10.1128/IAI.00319-16
- 1135 115. Rajeeve K, Das S, Prusty BK, Rudel T. Chlamydia trachomatis paralyzes neutrophils to evade
 1136 the host innate immune response. *Nature Microbiology* (2018) 3:824. doi: 10.1038/s41564-018-0182-
 1137 y
- 1138 116. Handing JW, Criss AK. The lipooligosaccharide-modifying enzyme LptA enhances
 1139 gonococcal defence against human neutrophils: LptA and gonococcal defence from neutrophils. *Cell*
 1140 *Microbiol* (2015) 17:910–921. doi: 10.1111/cmi.12411
- 1141 117. Varelle-Delarbre M, Miquel S, Garcin S, Bertran T, Balestrino D, Evrard B, Forestier C.
 1142 Immunomodulatory Effects of Lactobacillus plantarum on Inflammatory Response Induced by
 1143 Klebsiella pneumoniae. *Infect Immun* (2019) 87: doi: 10.1128/IAI.00570-19
- 1144 118. Martín R, Soberón N, Vaneechoutte M, Flórez AB, Vázquez F, Suárez JE. Characterization of
 1145 indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *Int Microbiol* (2008)
 1146 11:261–266. doi: 10.2436/20.1501.01.70
- 1147 119. Martín R, Sánchez B, Suárez JE, Urdaci MC. Characterization of the adherence properties of
 1148 human Lactobacilli strains to be used as vaginal probiotics. *FEMS Microbiol Lett* (2012) 328:166–173.
 1149 doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02495.x
- 1150 120. Mastromarino P, Di Pietro M, Schiavoni G, Nardis C, Gentile M, Sessa R. Effects of vaginal
 1151 lactobacilli in Chlamydia trachomatis infection. *International Journal of Medical Microbiology* (2014)
 1152 304:654–661. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.04.006
- 1153 121. Gong Z, Luna Y, Yu P, Fan H. Lactobacilli Inactivate Chlamydia trachomatis through Lactic

- 1154 Acid but Not H₂O₂. *PLoS One* (2014) 9: doi: 10.1371/journal.pone.0107758
- 1155 122. Nardini P, Nahui Palomino RA, Parolin C, Laghi L, Foschi C, Cevenini R, Vitali B, Marangoni
1156 A. Lactobacillus crispatus inhibits the infectivity of Chlamydia trachomatis elementary bodies, in vitro
1157 study. *Sci Rep* (2016) 6: doi: 10.1038/srep29024
- 1158 123. Rizzo A, Florentin M, Buommino E, Donnarumma G, Losacco A, Bevilacqua N. Lactobacillus
1159 crispatus mediates anti-inflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to Chlamydia
1160 trachomatis infection in vitro. *Int J Med Microbiol* (2015) doi: 10.1016/j.ijmm.2015.07.005
- 1161 124. Płaczekiewicz J, Chmiel P, Malinowska E, Bączal P, Kwiatek A. Lactobacillus crispatus and its
1162 enolase and glutamine synthetase influence interactions between Neisseria gonorrhoeae and human
1163 epithelial cells. *J Microbiol* (2020) 58:405–414. doi: 10.1007/s12275-020-9505-9
- 1164 125. Phukan N, Parsamand T, Brooks AES, Nguyen TNM, Simoes-Barbosa A. The adherence of
1165 *Trichomonas vaginalis* to host ectocervical cells is influenced by lactobacilli. *Sex Transm Infect* (2013)
1166 89:455–459. doi: 10.1136/sextrans-2013-051039
- 1167 126. Breedveld AC, Schuster HJ, van Houdt R, Painter RC, Mebius RE, van der Veer C, Bruisten
1168 SM, Savelkoul PHM, van Egmond M. Enhanced IgA coating of bacteria in women with Lactobacillus
1169 crispatus-dominated vaginal microbiota. *Microbiome* (2022) 10:15. doi: 10.1186/s40168-021-01198-
1170 4
- 1171 127. Ocaña VS, Pesce de Ruiz Holgado AA, Nader-Macías ME. Selection of vaginal H₂O₂-
1172 generating Lactobacillus species for probiotic use. *Curr Microbiol* (1999) 38:279–284. doi:
1173 10.1007/p100006802
- 1174 128. O’Hanlon DE, Lanier BR, Moench TR, Cone RA. Cervicovaginal fluid and semen block the
1175 microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. *BMC Infect Dis* (2010)
1176 10:120. doi: 10.1186/1471-2334-10-120
- 1177 129. Manhanzva MT, Abrahams AG, Gamielien H, Froissart R, Jaspan H, Jaumdally SZ, Barnabas
1178 SL, Dabee S, Bekker LG, Gray G, et al. Inflammatory and antimicrobial properties differ between
1179 vaginal Lactobacillus isolates from South African women with non-optimal versus optimal microbiota.
1180 *Sci Rep* (2020) 10: doi: 10.1038/s41598-020-62184-8
- 1181 130. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of
1182 Vaginal Bacteria and d- and l-Lactic Acid Isomers on Vaginal Extracellular Matrix Metalloproteinase
1183 Inducer: Implications for Protection against Upper Genital Tract Infections. *mBio* (2013) 4:e00460-13.
1184 doi: 10.1128/mBio.00460-13
- 1185 131. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid Production by Vaginal Flora
1186 In Vitro Is Consistent with the Rate and Extent of Vaginal Acidification. *Infection and Immunity* (1999)
1187 67:5170–5175.
- 1188 132. Mirmonsef P, Hotton AL, Gilbert D, Burgad D, Landay A, Weber KM, Cohen M, Ravel J,
1189 Spear GT. Free glycogen in vaginal fluids is associated with Lactobacillus colonization and low vaginal
1190 pH. *PLoS ONE* (2014) 9:e102467. doi: 10.1371/journal.pone.0102467
- 1191 133. Breshears LM, Edwards VL, Ravel J, Peterson ML. Lactobacillus crispatus inhibits growth of
1192 Gardnerella vaginalis and Neisseria gonorrhoeae on a porcine vaginal mucosa model. *BMC Microbiol*
1193 (2015) 15:276. doi: 10.1186/s12866-015-0608-0
- 1194 134. Tyssen D, Wang Y-Y, Hayward JA, Agius PA, DeLong K, Aldunate M, Ravel J, Moench TR,
1195 Cone RA, Tachedjian G. Anti-HIV-1 Activity of Lactic Acid in Human Cervicovaginal Fluid. *mSphere*
1196 (2018) 3: doi: 10.1128/mSphere.00055-18
- 1197 135. Nunn KL, Wang Y-Y, Harit D, Humphrys MS, Ma B, Cone R, Ravel J, Lai SK. Enhanced
1198 Trapping of HIV-1 by Human Cervicovaginal Mucus Is Associated with Lactobacillus crispatus-
1199 Dominant Microbiota. *MBio* (2015) 6:e01084-01015. doi: 10.1128/mBio.01084-15
- 1200 136. Hoang T, Toler E, DeLong K, Mafunda NA, Bloom SM, Zierden HC, Moench TR, Coleman
1201 JS, Hanes J, Kwon DS, et al. The cervicovaginal mucus barrier to HIV-1 is diminished in bacterial
1202 vaginosis. *PLoS Pathog* (2020) 16: doi: 10.1371/journal.ppat.1008236

- 1203 137. Ñahui Palomino RA, Zicari S, Vanpouille C, Vitali B, Margolis L. Vaginal Lactobacillus
 1204 Inhibits HIV-1 Replication in Human Tissues Ex Vivo. *Front Microbiol* (2017) 8:906. doi:
 1205 10.3389/fmicb.2017.00906
- 1206 138. Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, Gurguis A, Faro S. Defense
 1207 factors of vaginal lactobacilli. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2001) 185:375–379.
 1208 doi: 10.1067/mob.2001.115867
- 1209 139. Stoyancheva G, Marzotto M, Dellaglio F, Torriani S. Bacteriocin production and gene
 1210 sequencing analysis from vaginal Lactobacillus strains. *Arch Microbiol* (2014) 196:645–653. doi:
 1211 10.1007/s00203-014-1003-1
- 1212 140. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev*
 1213 *Microbiol* (2005) 3:777–788. doi: 10.1038/nrmicro1273
- 1214 141. Ocaña VS, Pesce de Ruiz Holgado AA, Nader-Macías ME. Characterization of a Bacteriocin-
 1215 Like Substance Produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain. *Appl Environ Microbiol* (1999)
 1216 65:5631–5635. doi: 10.1128/AEM.65.12.5631-5635.1999
- 1217 142. Nilsen T, Swedek I, Lagenaur LA, Parks TP. Novel Selective Inhibition of Lactobacillus iners
 1218 by *Lactobacillus* -Derived Bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* (2020) 86:e01594-20. doi:
 1219 10.1128/AEM.01594-20
- 1220 143. Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Martín V, Ruiz-Barba JL, Rodríguez JM.
 1221 Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from
 1222 Lactobacillus gasseri EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. *BMC Microbiol* (2016)
 1223 16:37. doi: 10.1186/s12866-016-0663-1
- 1224 144. Gaspar C, Donders GG, Palmeira-de-Oliveira R, Queiroz JA, Tomaz C, Martinez-de-Oliveira
 1225 J, Palmeira-de-Oliveira A. Bacteriocin production of the probiotic Lactobacillus acidophilus KS400.
 1226 *AMB Expr* (2018) 8:153. doi: 10.1186/s13568-018-0679-z
- 1227 145. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles
 1228 in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* (2015) 13:620–630. doi:
 1229 10.1038/nrmicro3480
- 1230 146. Ñahui Palomino RA, Vanpouille C, Laghi L, Parolin C, Melikov K, Backlund P, Vitali B,
 1231 Margolis L. Extracellular vesicles from symbiotic vaginal lactobacilli inhibit HIV-1 infection of human
 1232 tissues. *Nat Commun* (2019) 10:5656. doi: 10.1038/s41467-019-13468-9
- 1233 147. Costantini PE, Vanpouille C, Firrincieli A, Cappelletti M, Margolis L, Ñahui Palomino RA.
 1234 Extracellular Vesicles Generated by Gram-Positive Bacteria Protect Human Tissues Ex Vivo From
 1235 HIV-1 Infection. *Front Cell Infect Microbiol* (2022) 11:822882. doi: 10.3389/fcimb.2021.822882
- 1236 148. Ziklo N, Huston WM, Taing K, Katouli M, Timms P. In vitro rescue of genital strains of
 1237 Chlamydia trachomatis from interferon- γ and tryptophan depletion with indole-positive, but not indole-
 1238 negative Prevotella spp. *BMC Microbiol* (2016) 16: doi: 10.1186/s12866-016-0903-4
- 1239 149. Østergaard O, Follmann F, Olsen AW, Heegaard NH, Andersen P, Rosenkrands I. Quantitative
 1240 Protein Profiling of Chlamydia trachomatis Growth Forms Reveals Defense Strategies Against
 1241 Tryptophan Starvation. *Mol Cell Proteomics* (2016) 15:3540–3550. doi: 10.1074/mcp.M116.061986
- 1242 150. Caldwell HD, Wood H, Crane D, Bailey R, Jones RB, Mabey D, Maclean I, Mohammed Z,
 1243 Peeling R, Roshick C, et al. Polymorphisms in Chlamydia trachomatis tryptophan synthase genes
 1244 differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest* (2003) 111:1757–1769. doi:
 1245 10.1172/JCI200317993
- 1246 151. Ziklo N, Vidgen ME, Taing K, Huston WM, Timms P. Dysbiosis of the Vaginal Microbiota
 1247 and Higher Vaginal Kynurenine/Tryptophan Ratio Reveals an Association with Chlamydia
 1248 trachomatis Genital Infections. *Front Cell Infect Microbiol* (2018) 8: doi: 10.3389/fcimb.2018.00001
- 1249 152. Ziklo N, Huston WM, Hocking JS, Timms P. Chlamydia trachomatis Genital Tract Infections:
 1250 When Host Immune Response and the Microbiome Collide. *Trends Microbiol* (2016) 24:750–765. doi:
 1251 10.1016/j.tim.2016.05.007

- 1252 153. Klatt NR, Cheu R, Birse K, Zevin AS, Perner M, Noël-Romas L, Grobler A, Westmacott G,
1253 Xie IY, Butler J, et al. Vaginal bacteria modify HIV tenofovir microbicide efficacy in African women.
1254 *Science* (2017) 356:938–945. doi: 10.1126/science.aai9383
- 1255 154. Cheu RK, Gustin AT, Lee C, Schifanella L, Miller CJ, Ha A, Kim C, Rodriguez VJ, Fischl M,
1256 Burgener AD, et al. Impact of vaginal microbiome communities on HIV antiretroviral-based pre-
1257 exposure prophylaxis (PrEP) drug metabolism. *PLoS Pathog* (2020) 16: doi:
1258 10.1371/journal.ppat.1009024
- 1259 155. Taneva E, Sinclair S, Mesquita PM, Weinrick B, Cameron SA, Cheshenko N, Reagle K, Frank
1260 B, Srinivasan S, Fredricks D, et al. Vaginal microbiome modulates topical antiretroviral drug
1261 pharmacokinetics. *JCI Insight* (2018) 3: doi: 10.1172/jci.insight.99545
- 1262 156. Farr Zuend C, Noël-Romas L, Hoger S, McCorrison S, Westmacott G, Marrazzo J, Hillier SL,
1263 Dezzutti C, Squires K, Bunge KE, et al. Influence of dapivirine vaginal ring use on cervicovaginal
1264 immunity and functional microbiome in adolescent girls. *AIDS* (2021) 35:369–380. doi:
1265 10.1097/QAD.0000000000002751
- 1266 157. Thurman AR, Schwartz JL, Ravel J, Gajer P, Marzinke MA, Yousefieh N, Anderson SM,
1267 Doncel GF. Vaginal microbiota and mucosal pharmacokinetics of tenofovir in healthy women using
1268 tenofovir and tenofovir/levonorgestrel vaginal rings. *PLOS ONE* (2019) 14:e0217229. doi:
1269 10.1371/journal.pone.0217229
- 1270 158. Heffron R, McClelland RS, Balkus JE, Celum C, Cohen CR, Mugo N, Bukusi E, Donnell D,
1271 Lingappa J, Kiarie J, et al. Efficacy of oral pre-exposure prophylaxis (PrEP) for HIV among women
1272 with abnormal vaginal microbiota: a post-hoc analysis of the randomised, placebo-controlled Partners
1273 PrEP Study. *Lancet HIV* (2017) 4:e449–e456. doi: 10.1016/S2352-3018(17)30110-8
- 1274 159. Gyorke CE, Kollipara A, Allen J, Zhang Y, Ezzell JA, Darville T, Montgomery SA, Nagarajan
1275 UM. IL-1 α Is Essential for Oviduct Pathology during Genital Chlamydial Infection in Mice. *The*
1276 *Journal of Immunology* (2020) 205:3037–3049. doi: 10.4049/jimmunol.2000600
- 1277 160. Lavelle A, Hoffmann TW, Pham H-P, Langella P, Guédon E, Sokol H. Baseline microbiota
1278 composition modulates antibiotic-mediated effects on the gut microbiota and host. *Microbiome* (2019)
1279 7:111. doi: 10.1186/s40168-019-0725-3
- 1280 161. Perelman P, Johnson WE, Roos C, Seuánez HN, Horvath JE, Moreira MAM, Kessing B,
1281 Pontius J, Roelke M, Rumpler Y, et al. A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* (2011)
1282 7:e1001342. doi: 10.1371/journal.pgen.1001342
- 1283 162. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human
1284 immunology. *J Immunol* (2004) 172:2731–2738. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731
- 1285 163. Bjornson-Hooper ZB, Fragiadakis GK, Spitzer MH, Madhireddy D, McIlwain D, Nolan GP. A
1286 comprehensive atlas of immunological differences between humans, mice and non-human primates.
1287 *bioRxiv* (2019)574160. doi: 10.1101/574160
- 1288 164. Cunha GR, Sinclair A, Ricke WA, Robboy SJ, Cao M, Baskin LS. Reproductive tract biology:
1289 Of mice and men. *Differentiation* (2019) 110:49–63. doi: 10.1016/j.diff.2019.07.004
- 1290 165. Estes JD, Wong SW, Brenchley JM. Nonhuman primate models of human viral infections. *Nat*
1291 *Rev Immunol* (2018) 18:390–404. doi: 10.1038/s41577-018-0005-7
- 1292 166. Bell JD, Bergin IL, Schmidt K, Zochowski MK, Aronoff DM, Patton DL. Nonhuman Primate
1293 Models Used to Study Pelvic Inflammatory Disease Caused by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Dis*
1294 *Obstet Gynecol* (2011) 2011: doi: 10.1155/2011/675360
- 1295 167. Bakaletz LO. Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nat Rev Microbiol* (2004)
1296 2:552–568. doi: 10.1038/nrmicro928
- 1297 168. Peña JC, Ho W-Z. Non-Human Primate Models of Tuberculosis. *Microbiology Spectrum*
1298 (2016) 4:4.4.10. doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0007-2016
- 1299 169. Gardner MB, Luciw PA. Macaque models of human infectious disease. *ILAR J* (2008) 49:220–
1300 255. doi: 10.1093/ilar.49.2.220

- 1301 170. Zitsman JS, Alonso-Guallart P, Ovanez C, Kato Y, Rosen JF, Weiner JI, Duran-Struuck R.
 1302 Distinctive Leukocyte Subpopulations According to Organ Type in Cynomolgus Macaques. *Comp*
 1303 *Med* (2016) 66:308–323.
- 1304 171. Messaoudi I, Estep R, Robinson B, Wong SW. Nonhuman Primate Models of Human
 1305 Immunology. *Antioxid Redox Signal* (2011) 14:261–273. doi: 10.1089/ars.2010.3241
- 1306 172. Van Esch E, Cline JM, Buse E, Wood CE, de Rijk EPCT, Weinbauer GF. Summary
 1307 Comparison of Female Reproductive System in Human and the Cynomolgus Monkey (*Macaca*
 1308 *fascicularis*). *Toxicol Pathol* (2008) 36:171S-172S. doi: 10.1177/0192623308327415
- 1309 173. Weinbauer GF, Niehoff M, Niehaus M, Srivastav S, Fuchs A, Van Esch E, Cline JM.
 1310 Physiology and Endocrinology of the Ovarian Cycle in Macaques. *Toxicol Pathol* (2008) 36:7S-23S.
 1311 doi: 10.1177/0192623308327412
- 1312 174. Shaikh AA, Naqvi RH, Shaikh SA. Concentrations of oestradiol-17beta and progesterone in
 1313 the peripheral plasma of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) in relation to the length of the
 1314 menstrual cycle and its component phases. *J Endocrinol* (1978) 79:1–7. doi: 10.1677/joe.0.0790001
- 1315 175. Marlin R, Nugeyre M-T, Tchitchek N, Parenti M, Hocini H, Benjelloun F, Cannou C,
 1316 Dereuddre-Bosquet N, Levy Y, Barré-Sinoussi F, et al. Modified Vaccinia Virus Ankara Vector
 1317 Induces Specific Cellular and Humoral Responses in the Female Reproductive Tract, the Main HIV
 1318 Portal of Entry. *J Immunol* (2017) 199:1923–1932. doi: 10.4049/jimmunol.1700320
- 1319 176. George T. Spear, Douglas Gilbert, Masoumeh Sikaroodi, Lara Doyle, Linda Green, Patrick M.
 1320 Gillevet, Alan L. Landay, Ronald S. Veazey. Identification of rhesus macaque genital microbiota by
 1321 16S pyrosequencing shows similarities to human bacterial vaginosis: implications for use as an animal
 1322 model for HIV vaginal infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* (2010) 26: doi:
 1323 10.1089/aid.2009.0166
- 1324 177. Spear GT, Kersh E, Guenther P, Vishwanathan SA, Gilbert D, Zariffard MR, Mirmonsef P,
 1325 Landay A, Zheng L, Gillevet P. Longitudinal assessment of pigtailed macaque lower genital tract
 1326 microbiota by pyrosequencing reveals dissimilarity to the genital microbiota of healthy humans. *AIDS*
 1327 *Res Hum Retroviruses* (2012) 28:1244–1249. doi: 10.1089/AID.2011.0382
- 1328 178. Chen Z, Yeoh YK, Hui M, Wong PY, Chan MCW, Ip M, Yu J, Burk RD, Chan FKL, Chan
 1329 PKS. Diversity of macaque microbiota compared to the human counterparts. *Sci Rep* (2018) 8:15573.
 1330 doi: 10.1038/s41598-018-33950-6
- 1331 179. Rhoades NS, Hendrickson SM, Gerken DR, Martinez K, Slayden OD, Slifka MK, Messaoudi
 1332 I. Longitudinal Profiling of the Macaque Vaginal Microbiome Reveals Similarities to Diverse Human
 1333 Vaginal Communities. *mSystems* (2021) 6:e01322-20. doi: 10.1128/mSystems.01322-20
- 1334 180. Nugeyre M-T, Tchitchek N, Adapen C, Cannou C, Contreras V, Benjelloun F, Ravel J, Le
 1335 Grand R, Marlin R, Menu E. Dynamics of Vaginal and Rectal Microbiota Over Several Menstrual
 1336 Cycles in Female Cynomolgus Macaques. *Front Cell Infect Microbiol* (2019) 9: doi:
 1337 10.3389/fcimb.2019.00188
- 1338 181. Hallmaier-Wacker LK, Lüert S, Roos C, Knauf S. Lactation and menstruation shift the vaginal
 1339 microbiota in captive rhesus monkeys to be more similar to the male urethral microbiota. *Sci Rep*
 1340 (2019) 9:17399. doi: 10.1038/s41598-019-53976-8
- 1341 182. Mirmonsef P, Gilbert D, Veazey RS, Wang J, Kendrick SR, Spear GT. A comparison of lower
 1342 genital tract glycogen and lactic acid levels in women and macaques: implications for HIV and SIV
 1343 susceptibility. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2012) 28:76–81. doi: 10.1089/aid.2011.0071
- 1344 183. Miller EA, Beasley DE, Dunn RR, Archie EA. Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why
 1345 is the Human Vaginal Microbiome Unique? *Front Microbiol* (2016) 7: doi: 10.3389/fmicb.2016.01936
- 1346 184. Yu RR, Cheng AT, Lagenaur LA, Huang W, Weiss DE, Treece J, Sanders-Bear BE, Hamer
 1347 DH, Lee PP, Xu Q, et al. A Chinese rhesus macaque (*Macaca mulatta*) model for vaginal *Lactobacillus*
 1348 colonization and live microbicide development. *J Med Primatol* (2009) 38:125–136. doi:
 1349 10.1111/j.1600-0684.2008.00316.x

1350 185. Langner CA, Ortiz AM, Flynn JK, Kendall H, Lagenaur LA, Brenchley JM. The Vaginal
 1351 Microbiome of Nonhuman Primates Can Be Only Transiently Altered to Become *Lactobacillus*
 1352 Dominant without Reducing Inflammation. *Microbiol Spectr* (2021) 9:e01074-21. doi:
 1353 10.1128/Spectrum.01074-21

1354 186. Mahajan G, Doherty E, To T, Sutherland A, Grant J, Junaid A, Gulati A, LoGrande NT, Izadifar
 1355 Z, Timilsina SS, et al. Vaginal microbiome-host interactions modeled in a human vagina-on-a-chip.
 1356 [preprint]. *Microbiology* (2022). doi: 10.1101/2022.03.20.485048

1357
 1358
 1359 **12 Legends:**
 1360

1361 **Figure 1: Vaginal microbiota and female reproductive tract inflammation**

1362 An eubiotic vaginal microbiota is dominated by *Lactobacillus spp* that can produce different
 1363 metabolites such as sugar, lactate, amino acid and dipeptide. This environment is associated with a low
 1364 inflammation including cytokine production and immune cells recruitment (left panel). On the
 1365 contrary, a more diverse vaginal microbiota (low *Lactobacillus spp* and high anaerobic bacteria
 1366 abundances) is associated with an increased inflammation. The microbial environment leads to the
 1367 production of metabolites linked to vaginal discomfort such as vaginal discharges or amine odor. In
 1368 this context, higher production of cytokines and recruitment of T cells (Th17 and CCR5+ CD4+ T
 1369 cells) are detected (right panel).

1370
 1371 **Figure 2: Association between factors affecting the vaginal microbiota and the effect on**
 1372 **inflammation**

1373 The vaginal microbiota can be influenced by numerous factors including sexually transmitted infection,
 1374 hormonal contraception, menstrual cycle, ethnicity, sexual behaviors, hygiene practices, stress,
 1375 nutrition etc. Those factors by influencing the vaginal microbiota will affect the FRT inflammation
 1376 including cytokine production, T cell recruitment and neutrophil activation and maturation.

1377
 1378 **Figure 3: Mechanisms of action associated with *Lactobacillus spp* presence**

1379 *Lactobacillus spp.* decrease the risk of sexually transmitted infection acquisition by several
 1380 mechanisms: (1) Aggregation to epithelial cells protecting the cells from pathogen; (2) Maintenance
 1381 of mucus integrity; (3) Low inflammation (low production of cytokine and immune cells recruitment);
 1382 (4) Production of factors (lactic acid, bacteriocins, H₂O₂, extracellular vesicles) involved in pathogen
 1383 inhibition.

1384
 1385 **Figure 4: Contribution of the female NHP model in the understanding of the mechanisms**
 1386 **involved in sexually transmitted infection acquisition and control.**

1387 NHP and Human similarities include NHP susceptibility to several STI affecting Human, FRT
 1388 anatomy, menstrual cycle, immune cells presence and vaginal microbiota composition. This model
 1389 also allows the longitudinal collection of tissue samples, stool, blood or cervicovaginal fluids.

1390 Therefore, NHP can be used to study various parameters involved in STI acquisition and control
1391 including time and route of infection, susceptibility to infection/co-infection, physiopathology,
1392 hormone effects, in deep evaluation of the immune system, probiotic/prebiotic/vaccine/drug testing.

1393

1394

In review

Figure 1.TIF

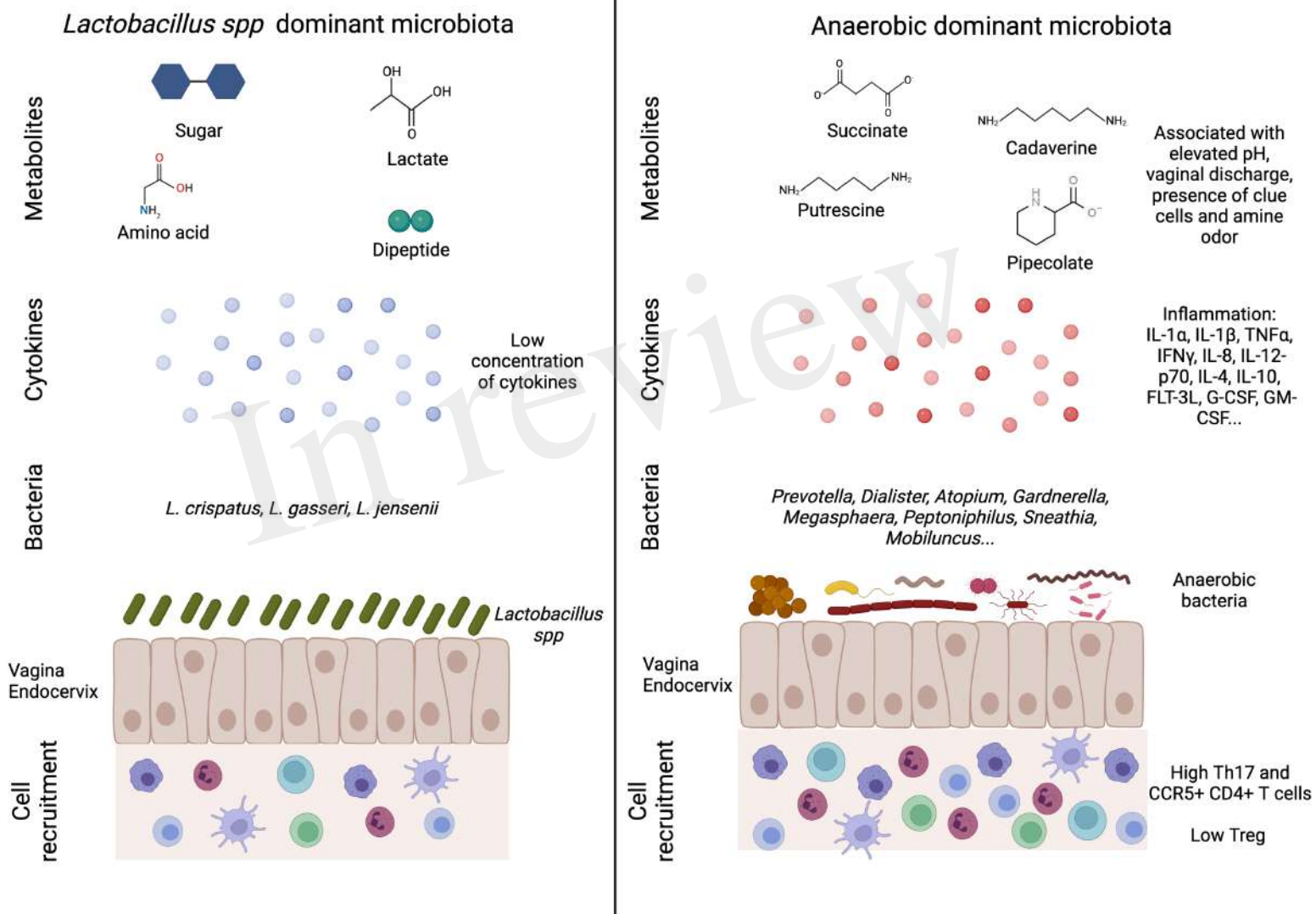


Figure 2.TIF

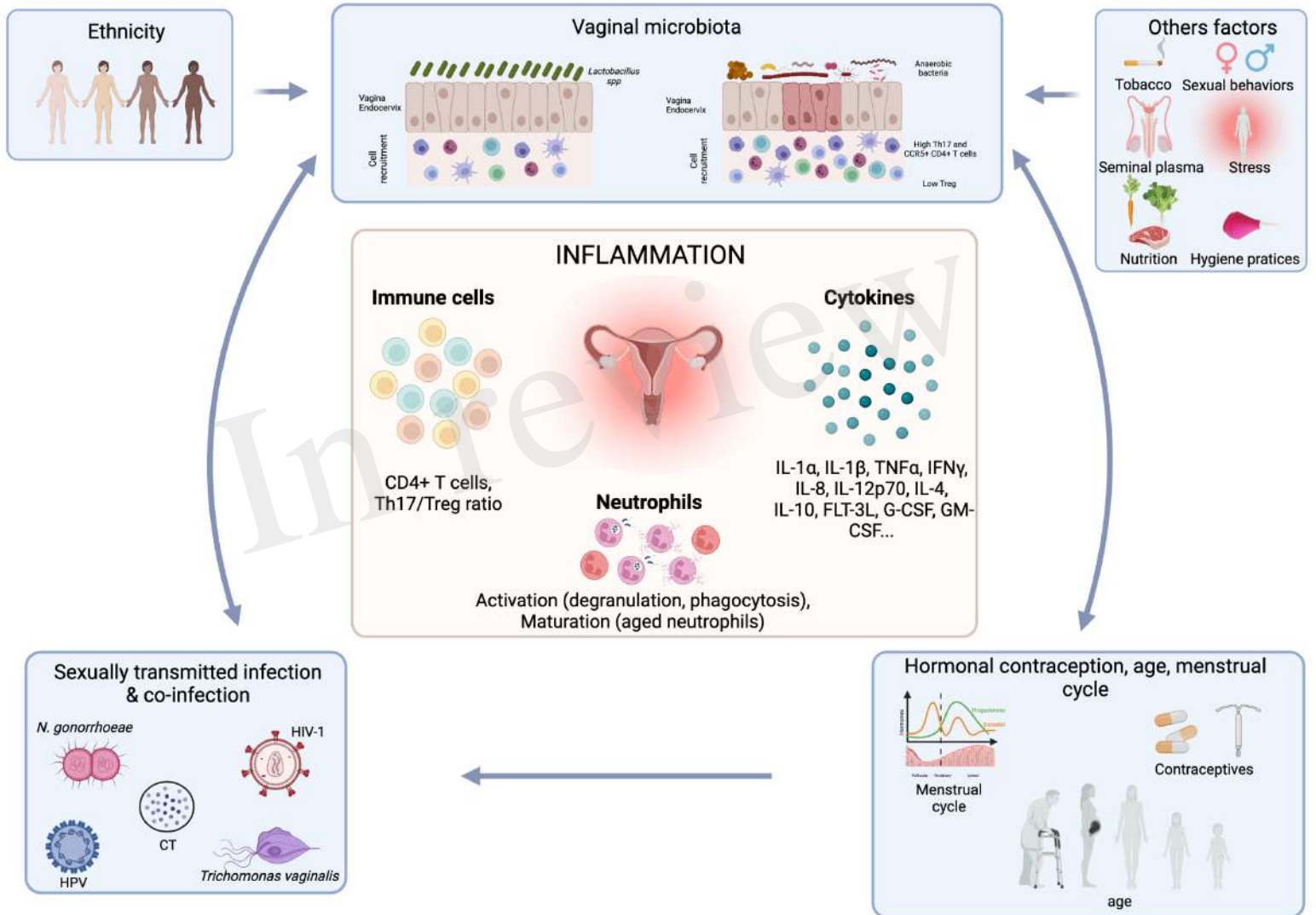


Figure 3.TIF

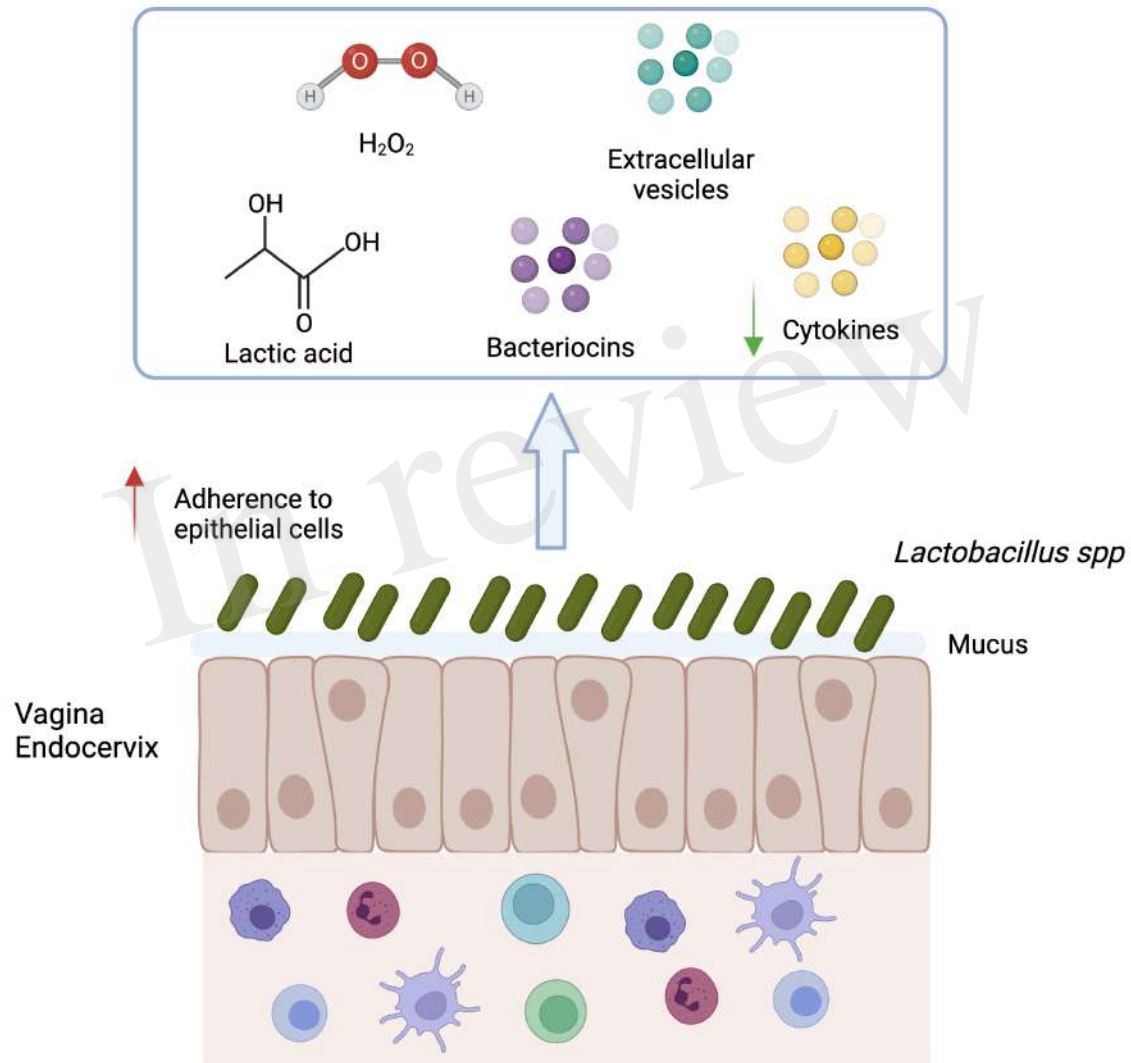
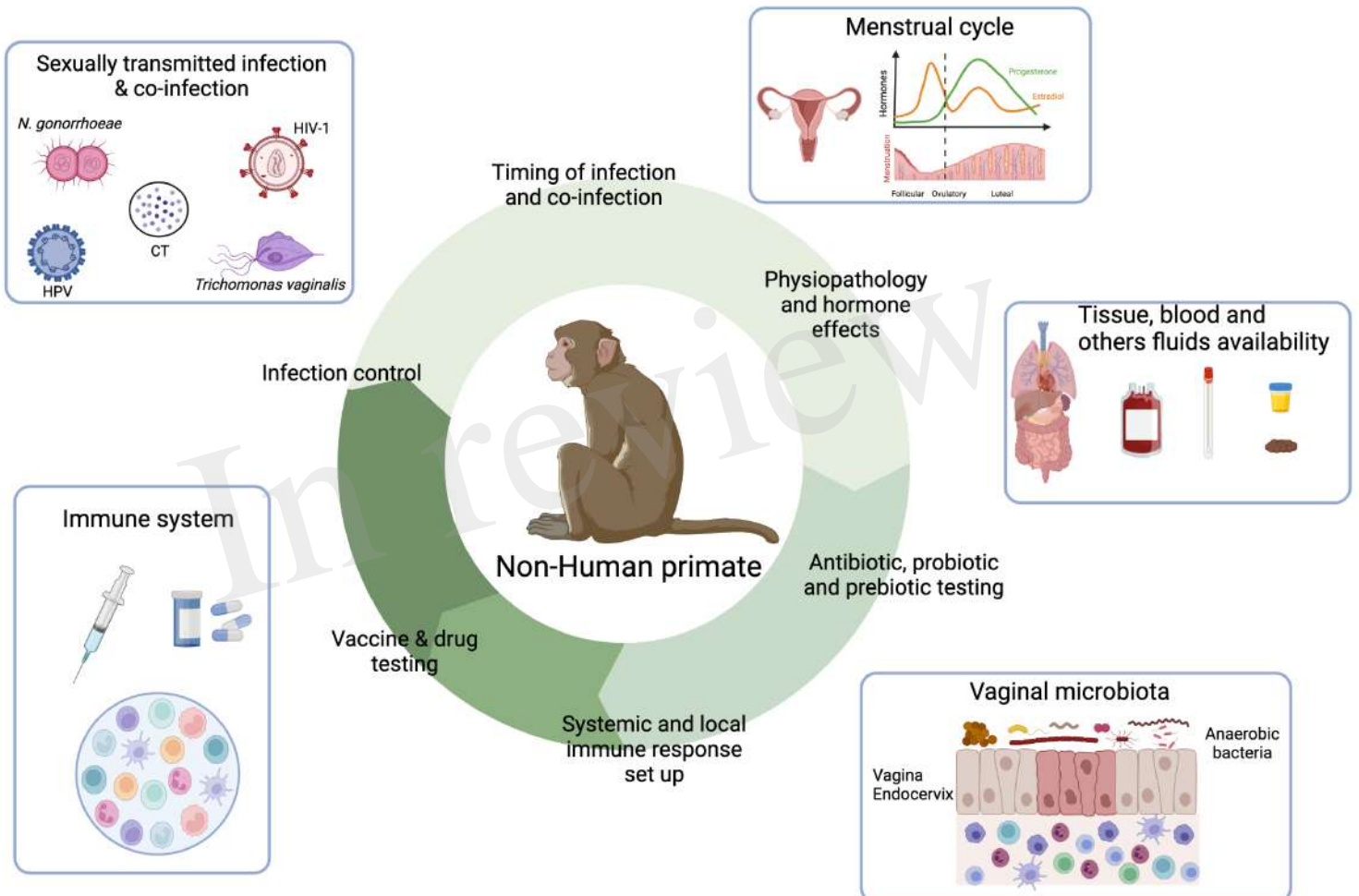


Figure 4.TIF



Annexe 2 : Article 4

« Influence of vaginal microbiota composition on cervicovaginal and systemic inflammation induced by *Chlamydia trachomatis* infection. »

Article en préparation pour *Microbiome*.

Influence of vaginal microbiota composition on cervicovaginal and systemic inflammation induced by *Chlamydia trachomatis* infection.

Cindy Adapen¹, Louis Réot¹, Natalia Nunez², Claude Cannou^{1,3}, Romain Marlin¹, Julien Lemaître¹, Ségolène Diry², Léo d'Agata³, Sabine Lakoum², Eric Ginoux², Wesley Gros¹, Anne-Sophie Gallouet¹, Marco Leonec¹, Nathalie Bosquet¹, Roger Le Grand¹, Marie-Thérèse Nugeyre^{1,3}, Elisabeth Menu^{1,3}

¹CEA-Université Paris Saclay-Inserm U1184, Immunology of viral infections, autoimmune diseases, hematological and bacterial diseases/IDMIT Department/DRF/IBFJ, Fontenay-aux-Roses, France

²Life&Soft, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

³MISTIC group, department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France

ABSTRACT:

Background: *Chlamydia trachomatis* (CT) is a sexually transmitted infection (STI) that increases local inflammation by inducing the production of cytokines and the recruitment of immune cells such as neutrophils. However, very few is known on the impact of CT infection on cervicovaginal neutrophil phenotype. Vaginal microbiota is known to be a key factor within the female reproductive tract (FRT) in the regulation of local immune responses and STI acquisition where *Lactobacillus spp* are associated with protection. This study was performed in cynomolgus macaques which have a naturally diverse vaginal microbiota poor in *Lactobacillus spp* and rich in anaerobic bacteria that are also detected in women suffering from dysbiosis. We hypothesized that a modified vaginal microbiota enriched with *L. crispatus* in female cynomolgus macaques would decrease the inflammation induced by CT and/or the susceptibility to CT infection. During this study, the vaginal microbiota of cynomolgus macaques was enriched with *L. crispatus* after local metronidazole treatment followed by repeated intravaginal inoculations of CT. Vaginal microbiota composition (full 16S rRNA sequencing), CT infection and local and systemic inflammation were monitored (cytokine/chemokine concentrations, neutrophil phenotype/activation).

Results: A non-persisting CT infection, no association between *L. crispatus* enrichment and a lower susceptibility to CT infection were detected. However, the production of specific anti-CT IgG was higher in *L. crispatus* treated compared to untreated animals. T cell specific response in peripheral blood was mainly Th1 in both groups. Metronidazole treatment induced drastic modifications of the vaginal microbiota by reducing the abundance of several anaerobes and increasing the number of natural *Lactobacillus spp* (*L. johnsonii* and *L. prophage* mainly) as well as opportunistic bacteria such as *Streptococcus spp* and *Staphylococcus spp*. Surprisingly, *L. johnsonii* relative

abundance was positively associated with CT load, demonstrating an increased bacterial load in animals with high abundance of natural *Lactobacillus spp.* CT induced significant alteration of the vaginal microbiota during but also after infection. In terms of inflammation, peripheral blood and cervicovaginal cytokine concentrations were not significantly altered by CT infection in both groups. However, untreated animals exhibited an increased production of peripheral blood cytokines after CT infection, whereas it was the opposite in the cervicovaginal compartment where *L. crispatus* treated animals exhibited an increased production of cytokines compared to untreated animals. These results suggest a better local immune response as well as a better control on systemic inflammation upon CT infection in *L. crispatus* treated animals compared to untreated animals. Peripheral blood neutrophils were more mature and activated after CT infection/inoculation in both groups. As for cervicovaginal neutrophils, very few alterations of their phenotype were noticed after CT infection.

Conclusion: Those data highlight an impact of vaginal microbiota composition on the local and systemic immune responses induced by CT infection. Interestingly, we demonstrated that an increased abundance of *L. johnsonii* was associated with a higher CT load. Moreover, a significant and persisting alteration of the vaginal microbiota upon metronidazole and CT infection/inoculation was described. This study confirmed that vaginal microbiota composition can be a powerful tool to modulate local inflammation and STI susceptibility.

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) estimates that every year, 357 million people are affected with one of the following curable sexually transmitted infections (STIs): Chlamydia, Gonorrhoea, Syphilis or Trichomonas [1]. Those STIs continue to represent a major public health issue. In many countries, women between 15-24 years old that are sexually active have the highest risk of Chlamydia acquisition. *Chlamydia trachomatis* (CT) is an obligate intracellular gram-negative bacterium and serovar D to K are responsible for genital *Chlamydia* infection. Around 70% to 90% of CT infection in women are asymptomatic and without active screening, individuals stay infected and continue to spread the pathogen [2]. About 20-54% of CT infected patients self-resolve within a year whereas 23-30% become repeatedly infected [3–5]. Asymptomatic or symptomatic CT infection can induce chronic inflammation resulting in several diseases including cervicitis, cystalgias, urethral syndrome but the infection can also progress to the upper genital tract and induce salpingitis, inflammatory chronic pelvic disease and sterility.

CT preferentially infects the endocervical columnar epithelial cells of the female reproductive tract (FRT). In the FRT, pro-inflammatory cytokines such as IL-1 α , IL-1 β ,

IL-6, IL-8, TNF α , IL-12, IFN γ , IL-18 but also IL-10, VEGF, G-CSF and GM-CSF increase upon infection, resulting in a local inflammation [6–10]. Polymorphonuclear leukocytes (PMN) as well as other innate immune cells are recruited to the FRT during CT infection [7]. Neutrophils have been linked, in several studies, to immunopathology and are not directly necessary for the decrease of the bacterial burden upon CT infection [11, 12]. However, a study, in which serum from mice that resolve CT infection was passively transferred to CT reinfected mice, demonstrates that PMN are involved in bacterial burden reduction through antibody-mediated anti-CT immunity [13]. Those studies clearly demonstrated a dual effect of PMN during infection, on one hand they are essential for bacterial clearance and on another hand, when over activated and recruited, they increase the pathology. Those opposite roles could be due to differences in PMN subpopulations or activation status in the blood or in the FRT, which to our knowledge has not been described yet.

To clear CT infection, a Th1 response is essential; indeed, production of IFN γ has a central role in the immune response against CT infection. IFN γ induces the depletion of the intracellular pool of tryptophan through induction of the tryptophan catabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Tryptophan is converted into kynurenine, resulting in the inhibition of *Chlamydia* growth. Interestingly, the microbiota composition has also an impact on CT infection. Indeed, indole which is produced by several anaerobic bacteria present within the vaginal microbiota, promotes CT infection in presence of IFN γ [3]. In fact, the kynurenine/tryptophan ratio is increased in CT infected women, and correlates with the presence of *Streptococcus spp.* and *Peptoniphilus spp.* [14]. Indole producing bacteria such as *Porphyromonas*, *Fusobacterium* or *Peptoniphilus* as well as *G. vaginalis* are highly represented in women suffering from bacterial vaginosis. Therefore a highly diverse microbiota with a predominance of anaerobic bacteria and absence or few *Lactobacillus spp.* increases the risk of CT infection [14–16]. On the contrary, a vaginal microbiota dominated by *Lactobacillus spp.* is associated with a decreased risk for CT infection [17]. An *in vitro* study demonstrated that *L. crispatus* strains, by producing both L and D-lactic acid, have the best anti-CT effect [18].

Many studies were performed in mice model with *C. muridarum* to understand CT infection. However, mice reproductive tract exhibits structural and functional differences compared to women FRT [19]. Moreover, pretreatment with progestins is necessary to induce CT and consistent *C. muridarum* infection in mice [2]. Cynomolgus macaques, in contrast to mice, have a FRT that is closely similar to the one of women in terms of morphology, endocrine system, menstrual cycle but also immune cell distribution within the FRT [20, 21]. In addition, macaques are susceptible to STI such as CT or Simian Immunodeficiency Virus (SIV) [22, 23]. Female cynomolgus macaques

have a highly diverse vaginal microbiota with few *Lactobacillus spp.* and many anaerobic bacteria such as *Sneathia*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptoniphilus*, *Bacteroides* and *Dialister*. Vaginal microbiota composition of cynomolgus macaques is thus similar to the one of women suffering from bacterial vaginosis [24].

To better study the impact of the vaginal microbiota composition on CT susceptibility and inflammation, the vaginal microbiota of female cynomolgus macaques was modified to enrich the microbiota in *Lactobacillus* species. We characterized the impact of the microbiota composition on CT infection susceptibility, innate immune specific responses (antibodies and T cell responses) and inflammation (ie PMN and soluble factors). The impact of CT infection on inflammation and microbiota composition was also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Twelve sexually mature adult female cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*), aged of 5 to 7 years old and originating from Mauritian AAALAC certified breeding centers were included in this study. All animals were housed in IDMIT facilities (CEA, Fontenay-aux-roses), under BSL-2 containment (Animal facility authorization #D92-032-02, Préfecture des Hauts de Seine, France) and in compliance with European Directive 2010/63/EU, the French regulations and the Standards for Human Care and Use of Laboratory Animals, of the Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, assurance number #A5826-01, US). This study was approved and accredited by the institutional ethical committee "Comité d'Ethique en Expérimentation Animale du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives" (CEtEA #44) under statement numbers A18-083. The study was authorized by the "Research, Innovation and Education Ministry" under registration number APAFIS#20692-2019051709424034v1. The twelve animals were housed in the same room in social groups of six animals under controlled conditions of humidity, temperature and light (12h light/dark cycles). The animals were fed once or twice a day with commercial monkey chow and fruits. Water was available *ad libitum*. They were provided with environmental enrichment including toys and novel food under the supervision of the CEA Animal Welfare Officer.

Experimental design

Twelve female cynomolgus macaques (MF1 to MF12) divided in two groups (Untreated and *L. crispatus* treated) were studied for four months and a half. Age, weight, haplotype and group distribution are summarized in supplementary table 1. According to the data previously obtained by our team (summary presented in Suppl Fig1), the

following protocol was selected to modify the microbiota composition. The experimental design is represented in the Figure 1A.

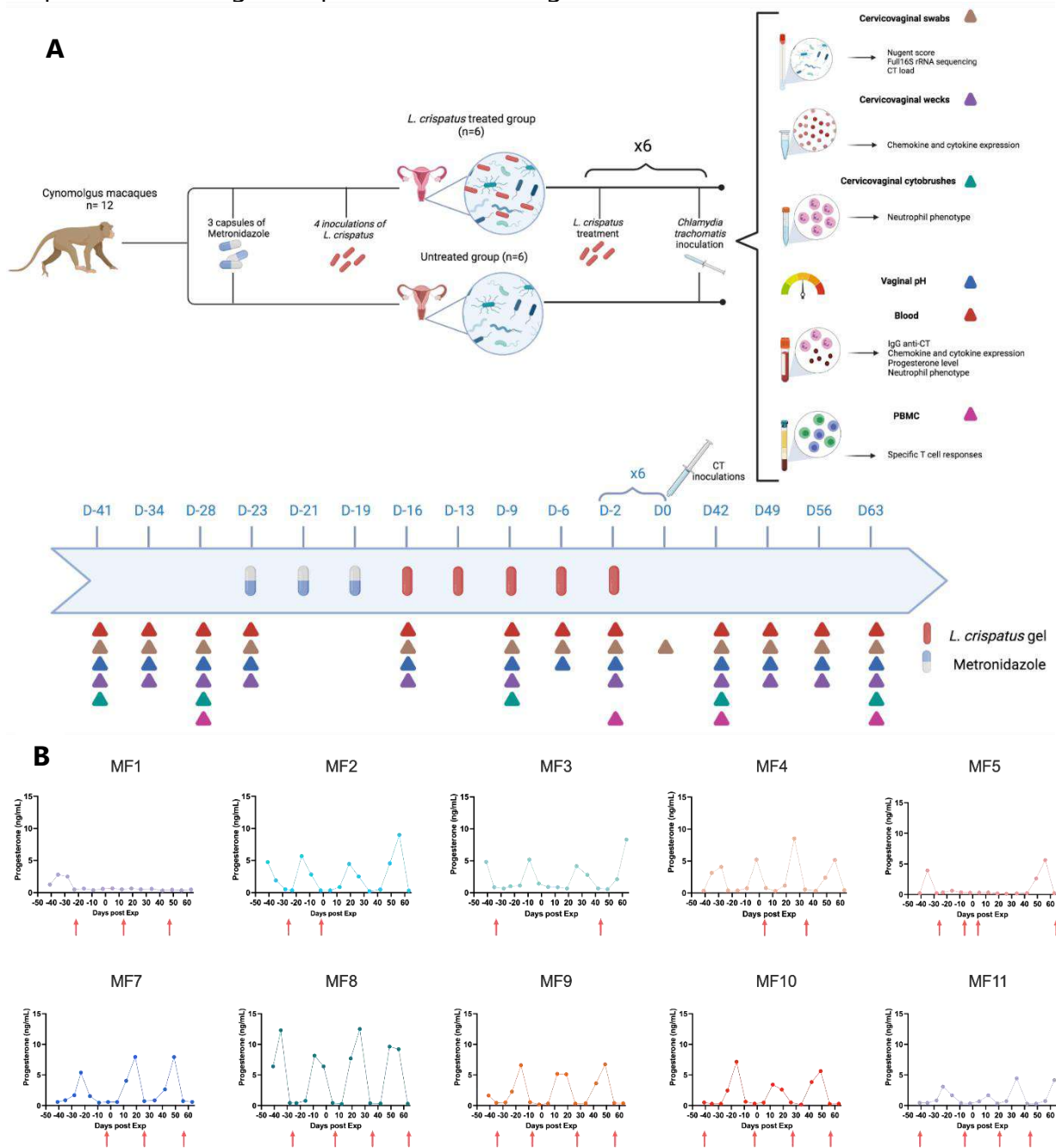


Figure 1: Experimental design and progesterone level. (A) Twelve female cynomolgus macaques were included in this study and divided in two groups of six animals. After four weeks of baseline, all animals received intravaginally three ovules of metronidazole during one week. Then animals from the *L. crispatus* treated group received four inoculations of *L. crispatus* gel at 10^{10} CFU (twice during two weeks) after washing the vaginal cavity with 0.02% of lactic acid. At D0, all animals were inoculated with a low dose of CT (10^4 IFU). At D-2 all animals within the *L. crispatus* treated group received the gel of *L. crispatus*. This design D-2/D0 was repeated six times, therefore all animals received six doses of CT. Then animals were studied during four weeks. Samples collection included: cervicovaginal swabs, cervicovaginal wecks, cervicovaginal cytobrushes, whole blood, PBMC and pH measurement. Created with Biorender.com. (B) Individual plots of the progesterone quantification (ng/mL) throughout the study. Red arrows represent menstruation.

On days -23, -21 and -19, all females received a reconditioned vaginal ovule (adapted to the macaque vaginal size) of $187.7 \text{ mg} \pm 17.8$ (mean \pm SD) of metronidazole (FLAGYL 500mg; SANOFI-AVENTIS). Then, a gel composed of 10^{10} *L. crispatus* was inoculated intravaginally on days -16, -13, -9 and -6 to the females of the treated group. At day 0, all the animals received intravaginally 10^4 IFU of *C. trachomatis* serovar D and two days before (D-2) the animals from the treated group also received intravaginally the gel of *L. crispatus*. The experimental design of D-2 and D0 was repeated every week for six weeks so each animal received a total of six inoculations of CT. After the six inoculations, the animals were followed up for four consecutive weeks [Fig1A]. After CT inoculations, two animals (MF6 and MF12) did not get infected nor developed specific antibodies against CT therefore these two animals were removed from all analysis. Only the results for animals: MF1, MF2, MF3, MF4, MF5, MF7, MF8, MF9, MF10, MF11 are displayed in the manuscript.

Sample collection

Whole blood, cervicovaginal fluids and swabs were collected [Fig1A] at baseline (days -42, -35, -28 and -23), after metronidazole treatments (day -16), after one and two weeks of *L. crispatus* inoculations or not (days -16 and -9), two days before each CT inoculation (days -2, 5, 12, 19, 26 and 34) and once a week during the follow up (days 42, 49, 56 and 63). Cervicovaginal samples for microbiota analysis were also collected before each CT inoculation (days 7, 14, 21, 28 and 36). Cervicovaginal cytobrushes were collected at five time points: at baselines (days -42 and -28), after antibiotic treatments and *L. crispatus* inoculations or not (day -9) and during follow up (days 42 and 63). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were gathered at baseline (day -28), two days before the first CT inoculation (day -2) and during the follow up (days 42 and 63). Sample collection order was as followed: Weck-Cel Spear during blood withdrawal, vaginal pH measurement, cervicovaginal swab and cervicovaginal cytobrushes. Cervicovaginal fluids were collected with a Weck-Cel Spear (Medtronic) placed in the vaginal vault for 2 min. Secretions were recovered from the spears by adding 600uL of elution buffer (PBS, NaCl 0.25M and protease inhibitor mixture; Merck Millipore, Fontenay-sous-Bois, France) and centrifuged at 13000xg for 20min. Secretions were then aliquoted and stored at -80°C before cytokine/chemokine quantification. Blood was collected and used for Complete Blood Count (CBC), then plasma and serum were collected, aliquoted and stored at -80°C for cytokine/chemokine and progesterone quantification. Cell Preparation tube (CPT) with Sodium Heparin were used to isolate mononuclear cells from peripheral blood (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) after centrifugation for 30 min at 3000 rpm. PBMC were collected at the top of the CPT gel surface and washed twice. Vaginal pH measurements were done by inserting a

neonate nasal swab (Copan Diagnostics Inc., Murrieta, CA, USA) into the vaginal cavity for few seconds then vaginal fluids were spread on a pH paper ranging from 4 to 7 and the value obtained was noted. Cervicovaginal samples for microbiota analysis were collected with nylon flocked swabs inserted in the vaginal vault and turned four to five times before storing in amies liquid (ELITech Microbio, France). Swabs were then aliquoted and either used for Nugent score or stored frozen at -80°C until DNA extraction. Cervicovaginal cells were collected using two successive cytobrushes (VWR; Belgium) inserted in the vaginal cavity and turned 4 to 5 times. After collection, the cytobrushes were put in a 15 mL tube containing 5 mL of RPMI with 10% Fecal Calf Serum (FCS) and 5% Penicillin streptomycin neomycin (PSN). The samples were conserved on ice block before processing.

Metronidazole ovules

Metronidazole ovules (Flagyl[®], Sanofi Aventis; Paris) of 500mg were put in a 5 mL tube and weight before putting in a water bath set at 37°C for few hours until complete melting. Melted ovules were then used to fill pediatric ovule adapted to the size of the macaque vaginal cavity (Herboristerie du Valmont; Belgium). Ovules were then weighted to determine the concentration of each antibiotic ovule and stored at 4°C before inoculation.

***L. crispatus* gel**

A capsule of 10^9 *L. crispatus* (Physioflor LP[®]; IPRAD PHARMA, Paris) was cultured in Mann Rogosa and Sharpe (MRS) liquid culture media (BD Bioscience) supplemented with L-cysteine (Sigma Aldrich) for 12h at 37°C with 10% CO_2 . Then, 50 μL were spread on a MRS agar (BD Bioscience) for 72h at 37°C with 10% CO_2 . An isolated colony (*Lactobacillus crispatus* strain IP174178) was amplified in liquid MRS culture medium (BD Bioscience) supplemented with L-cysteine (Sigma Aldrich) for 12h at 37°C with 10% CO_2 . The culture was diluted 1/100 and cultured until the exponential phase was reached (DO: 0,6). Three consecutive washing steps were performed with 1X PBS and centrifugation at 4000xg 20min to obtain the bacteria. Resuspension was performed with a gel composed of 1,5% Hydroxyethylcellulose gel (HEC; Sigma Aldrich), 9% sucrose (Sigma Aldrich), 0,05% lactic acid (Sigma Aldrich) and citrate buffer (Citric acid monohydrate; trisodium citrate dihydrate; H₂O milliQ). Syringes were filled with 1 mL of *L. crispatus* gel and frozen until use. Colony forming unit per mL (CFU/mL) were determined after serial dilutions of the gel and MRS plating before freezing. Moreover, the CFU/mL was also verified after each thawing.

C. trachomatis infection

Chlamydia trachomatis serovar D (D/UW3/Cx) were obtained from Dr Frank Follmann laboratory (SSI, Denmark) [25]. Briefly, batches of CT were produced by infecting HeLa cells then 2-3 days after infection, cells were harvested, and CT was purified from the cells. For animal inoculation, CT was diluted in Sucrose Phosphate Glutamate (SPG) buffer to achieve the expected concentration. Each animal received intravaginally 800 μ L of CT inoculum (10^4 IFU/800 μ L).

Progesterone quantification

Progesterone level was determined each week in peripheral blood plasma sample by ELISA (IBL international; Germany) according to manufacturer's instructions [Fig1B]. Animals had a normal menstrual cycle, most of the animals had three or more peaks of progesterone during the study. Only two animals (MF1 and MF5) had less than three peaks of progesterone.

Nugent score determination

Vaginal fluids obtained by swabbing were spread on a slide and fixed with heat (50°C) and 100% ethanol before Gram staining (RAL diagnostics; France). Slides were then observed with a 100X oil immersion lens using an Axioplan 2 microscope (Zeiss). Gram-positive rod-shaped bacteria, as well as non-rod-shaped bacteria, were counted in 10 random fields for each slide. The Nugent score was determined by adding the score of non-rod- and rod-shaped bacteria [Suppl table 2]. In women, a score from 7 to 10 indicates bacterial vaginosis, from 4 to 6 intermediated flora, and 0 to 3 normal flora [26].

***Chlamydia trachomatis* load**

Detection of CT in cervicovaginal samples was performed by qPCR. DNA was extracted using the kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen; Germany) according to manufacturer's instructions. As for qPCR, the kit Presto combined quantitative real time *Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoea* (Goffin Molecular Technologies; Netherlands) as well as a thermocycler CFX96TM real-time system (Biorad; USA) was used according to manufacturer's instructions.

Specific antibodies against CT

Specific IgG against CT were quantified by ELISA (Demeditec; Germany) in serum according to manufacturer's instructions. Goat anti-monkey IgG coupled with HRP at 50 ng/mL (Biorad, USA) was used for revealing. Optical density values at 450nm were obtained using a multimode microplate reader, the Spark 10M (TECAN; Switzerland).

Units of IgG anti-CT was calculated using the following formula: $(OD_{\text{sample}} \times 10) / OD_{\text{cutoff}}$ and multiplied by the dilution factor.

DNA extraction and full 16S rRNA gene sequencing

The PowerFecal DNA Pro isolation kit (Qiagen; Germany) was used following the manufacturer's instructions. 16S rRNA gene was amplified by PCR using specific 16S primers (27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' and 1492R: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') of the 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024, Oxford Nanopore Technologies) and LongAmp™ Taq 2× Master Mix (New England Biolabs). PCR conditions used were 1 min of denaturation at 95 °C, 30 cycles of denaturation (20 secs at 95 °C), annealing (30 secs at 55 °C) and extension (2 min at 65 °C). A final extension step was added for 5 min at 65 °C. PCR products were washed using AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA) and quantified using QuBit fluorometer and HS DNA kit (Invitrogen). Twenty-four barcoded samples were pooled and 100 fmol (~100 ng) were used for library preparation on one R9.4 flow cell. GridION™ was used for sequencing (Oxford Nanopore Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Cytokine and chemokine quantification

Pro- and anti-inflammatory cytokines as well as chemokines were quantified in cervicovaginal fluids and plasma by 23plex assay (NHP cytokine magnetic bead panel kit; Merck Millipore; Germany) for the detection of: G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23(p40), IL-13, IL-15, IL-17A, CCL2, CCL3, CCL4, sCD40L, TGF α , TNF α , VEGF, IL-18, according to manufacturer's instructions.

Neutrophil phenotyping

Neutrophil populations were analyzed in whole blood and cells obtained from cervicovaginal cytobrushes. Cervicovaginal cells were filtered with 35 μ m filter (Corning Falcon; USA). Then, cervicovaginal cells and whole blood were incubated with the antibodies listed in the supplementary table 3, washed and fixed with FACS lysing buffer (BD, Biosciences) or BD cell Fix solution (BD, Biosciences). A fourteen-color panel, containing neutrophil surface markers of maturation and activation, were used. Neutrophils were identified as CD45 positive Lineage negative (CD3, CD8, CD20, CD123, CD14, CDw125) and CD66abce positive. CD10 and CD101 were used to determine maturity. CD62L shedding and CD11b increased expression were assessed to attest the priming status of blood neutrophils [27]. CD32a, CD64, PD-L1 and HLA-DR complete the panel to study the activation of neutrophils in both compartments. Phenotyping was performed on a Fortessa (BD, Biosciences) with DIVA (BD) and FlowJo

(Tristar, USA) software. The gating strategy for the cervicovaginal cytobrushes is described in the supplementary Fig 2.

Peripheral T cell responses

Specific Th1, Th2 and Th17 responses were assessed after *in vitro* stimulation of PBMC. Cells were plated with co-stimulation markers (CD28 and CD49d) and Brefeldin A (10µg/mL; Sigma-Aldrich) in addition to different stimuli. Cells were either unstimulated, stimulated with PMA (6,2µg/mL; Sigma-Aldrich) and ionomycin (72µg/mL; Sigma-Aldrich) inactivated *Chlamydia trachomatis* (iCT; 5µg/mL), CT043 or CT681 CT peptides (2µg/mL) (ProteoGenix, France) overnight at 37°C. Cells were then permeabilized using Cytotfix/Cytoperm reagent (BD Biosciences) and Perm/Wash buffer (BD Biosciences) and frozen. The antibody list in the supplementary table 4 were used for intracellular staining and a LSRII with DIVA (BD Biosciences) and FlowJo software (Tristar, USA) were used for the analysis.

Microbiota and Statistical analysis

Sequence reads were converted into FASTQ files. A quality using NanoFilt was applied. Reads were filtered on quality metrics (Q > 10) and on read length (reads between 1200-1800 bp were kept. SILVA138_16S_pintail_100 ([Index of /frogs databanks/assignation/SILVA/16S \(inra.fr\)](#)) was used for assignation using Minimap2 for alignment. A supplementary filter was applied on alignment metrics and on the percentage of identity. Species abundance was obtained per sample (reads assigned to one species/total reads of the sample). Raw abundance file was converted to a biom file and Phyloseq object was created using FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) [28] implemented on a galaxy instance (<http://migale.jouy.inra.fr/galaxy/>). Finally, to study differentially abundant species in different conditions, we used DESeq2 [29]. Heatmaps representing fold change of cytokine/chemokine concentration in cervicovaginal fluids or plasma were obtained by Tableau software (Seattle, USA). GraphPad prism software version 9 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) was used for graphical representation of the vaginal microbiota, cytokine concentration, and neutrophil subpopulations. Significant differences between groups were confirmed using either a Mann Whitney, a two-way ANOVA test with p value adjustment with Turkey test or Kruskal-Wallis test with p values adjustment with Dunn's test.

RESULTS

Metronidazole treatment increases the abundance of natural *Lactobacillus spp*

To study the vaginal microbiota composition, the vaginal microbiota was characterized at each time point for all females by 16S rRNA sequencing. At the baseline, six

dominant phyla were present in all animals (total mean abundance ranging from maximum to minimum): *Firmicutes* (51.58% to 92.24%), *Campylobacterota* (1.60% to 26.19%), *Proteobacteria* (0.23% to 25.83%), *Fusobacteriota* (0.78% to 20.48%), *Bacteroidota* (1.37% to 6.54%), *Actinobacteriota* (0.03% to 8.52%). The other phyla represented less than 1% of the total abundance [Suppl Fig3]. A representation of the top 9 most abundant species detected in each animal during baseline is shown in [Suppl Fig4]. This representation highlights differences in terms of bacterial composition at the species level. However, many species were observed in several animals including *Campylobacter spurotum*, *Campylobacter ureolyticus*, *Peptococcus simae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, species from the genus *Anaerococcus* and *Shuttleworthia* for instance. Then, to evaluate the impact of antibiotic treatment as well as *L. crispatus* treatment on bacterial species composition, a DEseq2 analysis was performed. A heatmap representing the log10 expression of differentially abundant species between the baseline timepoints and the point after antibiotic treatment was generated [Fig2]. The main species (*Prevotella timonensis*, *Peptoniphilus grossensis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Fusobacterium gonidiaformans*, *Parvimonas sp*, *Peptococcus simae*, *Campylobacter ureolyticus*, *Dialister, micraerophilus*, *Campylobacter sputorum*...) detected at baseline significantly decreased after antibiotic treatment. In contrast, some species were increased after antibiotic treatment including *Fastidiosipila sanguinis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Actinotignum Shaalii* in addition to several *Lactobacillus spp.* (*L. murinus*, *L. animalis*, *L. prophage*, *L. johnsonii*) [Fig2; Suppl table 5]. So, a decreased abundance of several anaerobic species as well as an increase of endogenous *Lactobacillus spp* in addition to opportunistic bacteria such as *S. aureus* was demonstrated after metronidazole treatment. To determine the effect of *L. crispatus* treatment or not on microbiota composition, a heatmap representing the log10 expression of differentially abundant bacteria between samples collected after antibiotic treatment and two weeks after *L. crispatus* inoculations or not was generated. *L. crispatus* was detected in the treated group only [Fig3A]. In addition, *L. crispatus* treatment induced an increase of several bacteria including *L. reuteri*, *Gemella haemolysans*, *Peptoniphilus. grossensis*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas sp.* [Fig3A; Suppl table 6]. Without *L. crispatus* treatment [Fig3B], animals show an increase in several bacterial taxa associated with bacterial vaginosis in women such as *E. coli*, *Helcococcus sueciensis*, *Peptoniphilus grossensis*, *Proteus spp.*, *S. aureus* as well as *Streptococcus spp.* In contrary, a slight decrease of *Lactobacillus murinus* and *L. animalis* was detected [Fig3B; Suppl table 7]. Therefore, the effect of metronidazole is transient, and species associated with women bacterial vaginosis are detected again two weeks after antibiotic treatment in *L. crispatus* untreated animals.



Figure 2: Variation of species after metronidazole treatment in all animals. A DEseq2 analysis was performed to evaluate differentially abundant species after metronidazole treatment compared to baseline. Heatmap representing the fold change after \log_{10} transformation of species increased or decreased in both conditions. Light blue and dark purple time points match baseline and after metronidazole treatment respectively. The scale starts from 0 to above 5, red represents an increased abundance of the species. Species identification is on the right of the heatmap and sample ID on the bottom.

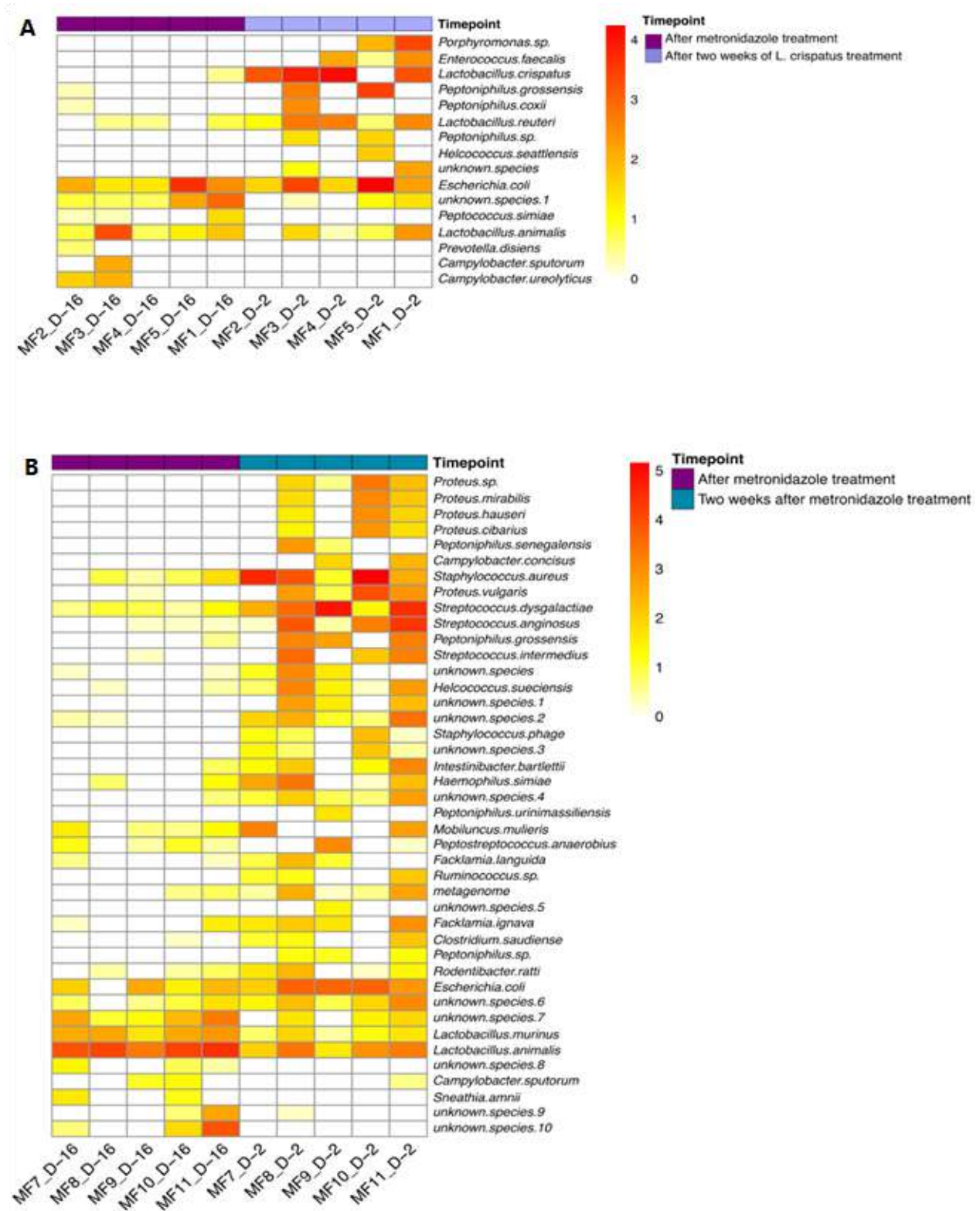


Figure 3: Variation of species after four inoculations of *L. crispatus* or not. A DEseq2 analysis was performed to evaluate differentially abundant species after *L. crispatus* inoculations or not compared to after metronidazole treatment. Heatmap representing the fold change after log₁₀ transformation of species increased or decreased in both conditions in the *L. crispatus* treated group (A) and in the untreated group (B). Light purple, turquoise and dark purple time points match after *L. crispatus* inoculation (A) or no treatment (B) and after metronidazole treatment respectively. The scale starts from 0 to above 4 or 5, red represents an increased abundance of the species. Species identification is on the right of the heatmap and sample ID on the bottom.

No differences for CT infection were observed between the *L. crispatus* treated and untreated groups but specific anti-CT IgG production was higher in *L. crispatus* treated infected animals

CT infection was monitored by quantifying CT load in cervicovaginal swabs and by measuring anti-CT IgG production in serum of all the females once a week [Fig4 A & B]. Females displayed a non-persisting infection independently of their group (*L. crispatus* treated or untreated) with one or more peaks of CT load. Individuals were mostly infected after the first or second inoculation [Fig4C]. Only MF2 from the treated group was infected after the third inoculation. Area under the curve (AUC) for CT load was calculated for all individuals, and no significant differences was observed between the two groups [Fig4D, left]. Specific anti-CT IgG in the serum were detected between one to three weeks after a peak of CT load [Fig4B & C]. Graphical representation of CT specific IgG in both groups highlighted a higher production of antibodies in the serum of animals from the *L. crispatus* treated group [Fig4B]. AUC determination for anti-CT IgG curves showed a significant difference between both groups [Fig4D, right]. To conclude, animals were infected but none of them developed a persistent infection. There was no difference of susceptibility to CT between the *L. crispatus* treated and untreated groups suggesting that *L. crispatus* probiotic treatment once a week does not protect from CT infection. However, animals that received *L. crispatus* treatment developed a higher anti-CT specific IgG response.

CT infection induces mainly a Th1 immune response in both groups

In addition to antibody quantification and CT load measurement, the specific T cell responses were monitored by intracellular staining of PBMC after *in vitro* restimulation with CT peptides (CT043 and CT681) or inactivated CT (iCT). Restimulation with CT043 and CT681 induce similar T cell profile (activation status and cytokine production) as iCT but weaker therefore only the result for iCT is represented in figure 5A and B. Upon restimulation with iCT, we observed in both groups a CD4⁺ Th1 response indeed production of IL-2, IFN γ and TNF α were detected at D42 and D63 [Fig5A]. However, there is a strong variation between animals. In the *L. crispatus* treated group the PBMC of two animals (MF2 and MF4) at D42 and of three animals (MF2, MF4 and MF5) at D63 are able to produce higher level of Th1 cytokines compared to other animals. In the untreated group, three animals (MF8, MF10 and MF11) have a slightly higher production of Th1 cytokines compared to the other two animals. No significant difference was observed between the two groups of animals in terms of cytokine production [Fig5B]. IL-17a expression on CD4⁺ T cells can be observed but the response is low in both groups, no significant difference was detected between both groups [Fig 5B]. Even if no significant difference was determined between groups, a

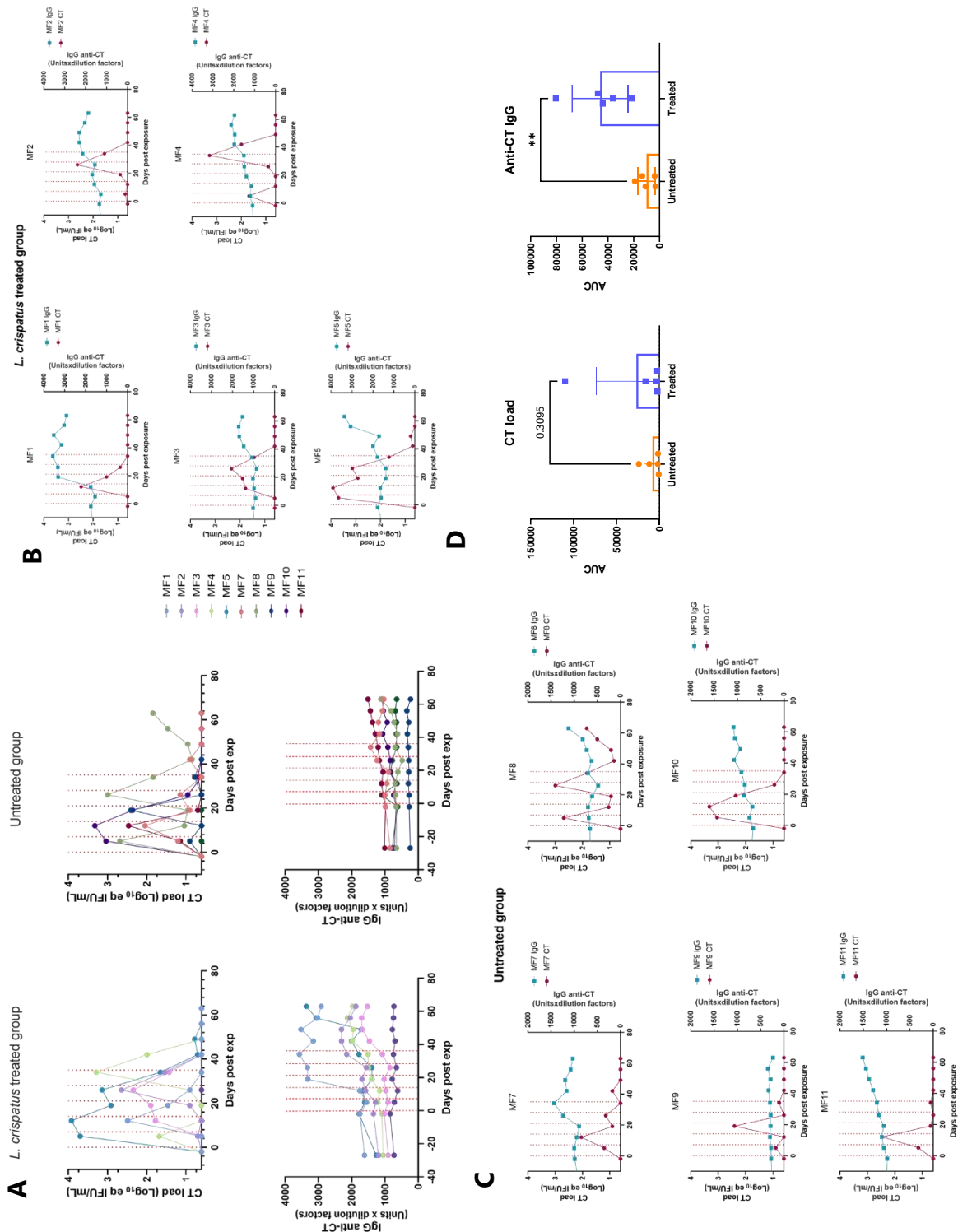


Figure 4: CT load and anti-CT IgG production in both groups. (A) Graphical representation of log₁₀ transformation CT load and anti-CT IgG production (Units x dilution factors) in *L. crispatus* treated (left) and untreated (right) animal throughout the study. Each color represents an animal. (C) Individual representation of CT load (log₁₀ transformation) and anti-CT IgG production in each animal throughout the study in the *L. crispatus* treated group (B) and Untreated group (C). Blue and red curves match anti-CT IgG and CT load respectively. Left y axis corresponds to CT load and right y axis corresponds to anti-CT IgG. (D) Area under the curve (AUC) calculation of CT load curves (left) and anti-CT IgG (right). A Mann-Whitney test was performed to compare AUC of CT load or anti-CT IgG between groups. Asterisks indicate a p value considered statistically significant (*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001).

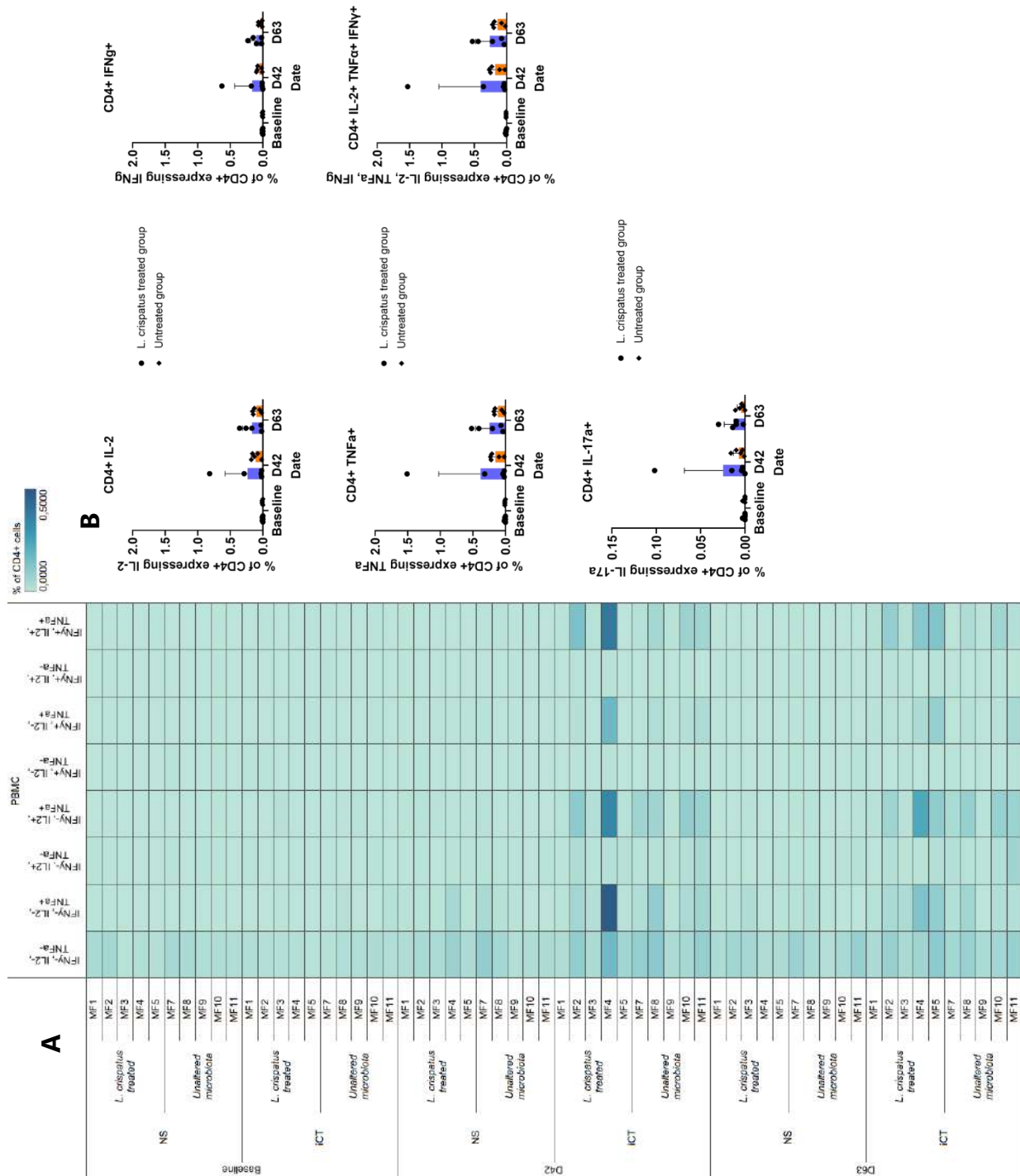


Figure 5: CD4+ T cells specific response in the blood after *in vitro* stimulation with inactivated CT. (A) Heatmap representing the percentage of CD4+ T cells expressing Th1 cytokines (IL-2, TNFα, IFNγ) at baseline, D42 and D63 with iCT *in vitro* stimulation or not (NS) in each animal. Dark blue represents a higher percentage of CD4+ T cells expressing one or a combination of Th1 cytokines. (B) Graphical representation of the percentage of CD4+ T cells expressing Th1 cytokines (IL-2, TNFα, IFNγ) or IL-17A at baseline, D42 and D63 with iCT *in vitro* stimulation or not (NS) in both groups.

slightly higher cytokine production is observed in the *L. crispatus* treated group compared to the untreated group for Th1 cytokines as well as IL-17A.

***L. johnsonii* abundance was associated with CT load in *L. crispatus* untreated animals**

To evaluate if CT load can be associated with a specific vaginal microbiota composition, individual bar plot of the top 9 most represented species in each animal was represented with CT load curves [Suppl Fig5]. Variation of relative abundance was observed in each individual without highlighting a clear association between species abundances and CT load. Then, to study the impact of *Lactobacillus spp.* on CT susceptibility, individual bar plot representation of *Lactobacillus spp* abundance overlaid with the bacterial load was made [Fig6 A and B]. In the treated group, the main species of *Lactobacillus* observed was *L. crispatus* [Fig6A]. Its abundance varied according to animals and time points. In the untreated group, *L. johnsonii* was the main *Lactobacillus* species observed [Fig6B]. Its abundance varied according to animal, but two females (MF8 and MF10) had high abundance of *L. johnsonii* at most of the time points. Interestingly, peaks of CT matched with high abundance of *L. johnsonii*. To further investigate if a specific bacterial composition at CT inoculation could facilitate or protect CT infection, the vaginal microbiota composition was compared in each group between CT inoculations that induced an infection or not. In the treated group, rather similar bacterial abundances were observed between CT inoculation that triggered an infection or not. However, in the untreated group, a higher abundance of *L. johnsonii* (4.73% vs 27%) and *L. prophage* (1.13% to 7.94%) was observed during CT inoculations that trigger CT infection [Fig7A]. Indeed, a positive association was determined, in the untreated group, between *L. johnsonii* (Spearman r: 0.43; p value: 0.0084) or *L. prophage* (Spearman r: 0.45; p value: 0.0084) with CT [Fig7B]. Simple linear regression analysis also demonstrated an association between relative abundance of *L. johnsonii* or *L. prophage* with CT load [Fig7C]. No positive or negative association was noticed in the *L. crispatus* treated group with *Lactobacillus spp* and the CT load [Data not shown]. Therefore, CT load seems to be positively associated to higher abundance of *L. johnsonii* and *L. prophage* in the untreated group.

Microbiota changes upon CT infection

Secondly, to determine the impact of CT infection on the vaginal microbiota composition, the samples of each animal during CT inoculation were divided into three groups: before, during or after CT infection, independently of their group affiliation [Fig8A and B]. Samples collected during follow up thus after CT inoculations were excluded of the analysis to avoid the effect of CT inoculation on the vaginal microbiota. The microbiota composition was altered by CT infection in most of the individuals [Suppl Fig 6]. To investigate bacterial taxa that were differentially abundant according to CT infection, a heatmap representing the log₁₀ expression of bacterial taxa abundance was generated between the time points before CT and during CT infection

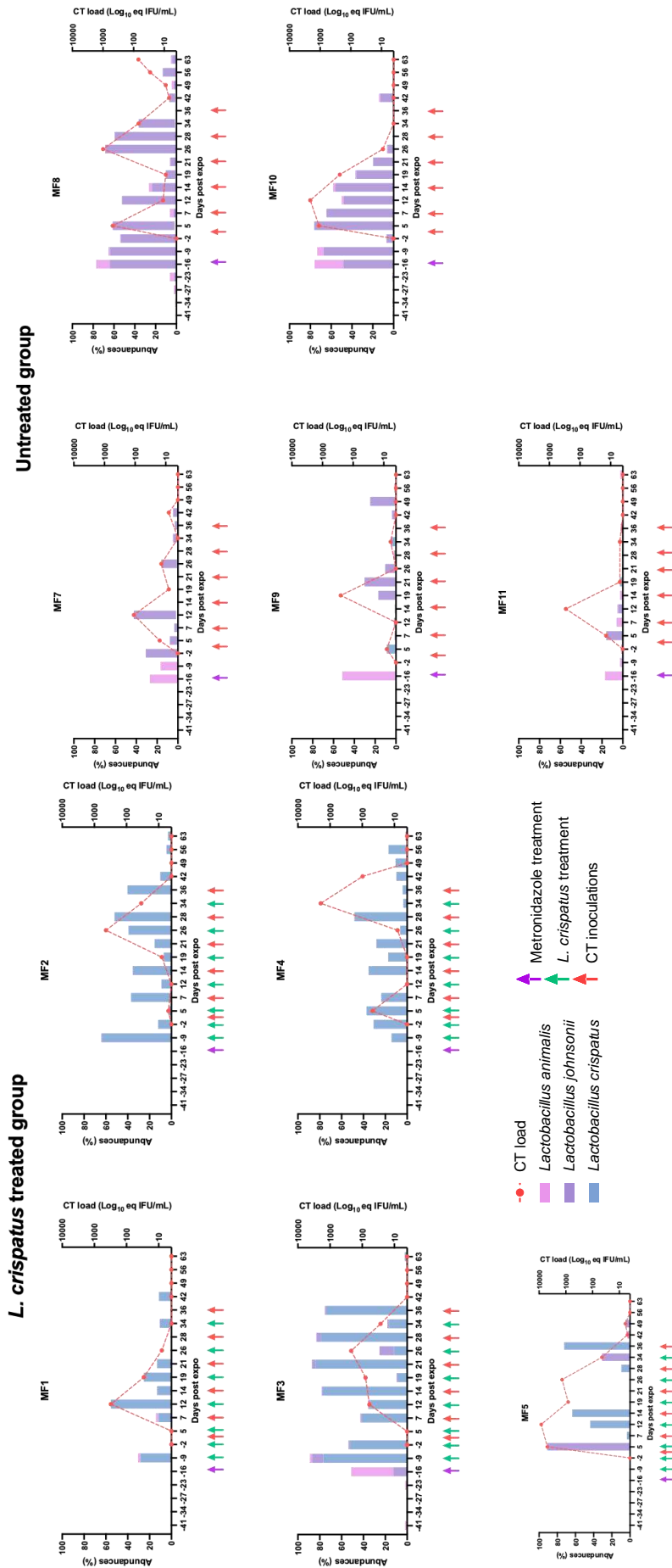


Figure 6: *Lactobacillus* spp abundances overlaid with CT load in each animal. Individual bar plot representing *Lactobacillus* spp abundances (%) in each animal from the *L. crispatus* treated group (A) and untreated group (B) superposed with CT load after log₁₀ transformation throughout the study. Red dotted line represents CT load. Bar plot color of *L. animalis* is pink, *L. johnsonii* is blue and *L. crispatus* is green. Purple, green and red arrows represent metronidazole treatment, *L. crispatus* inoculation and CT inoculation respectively.

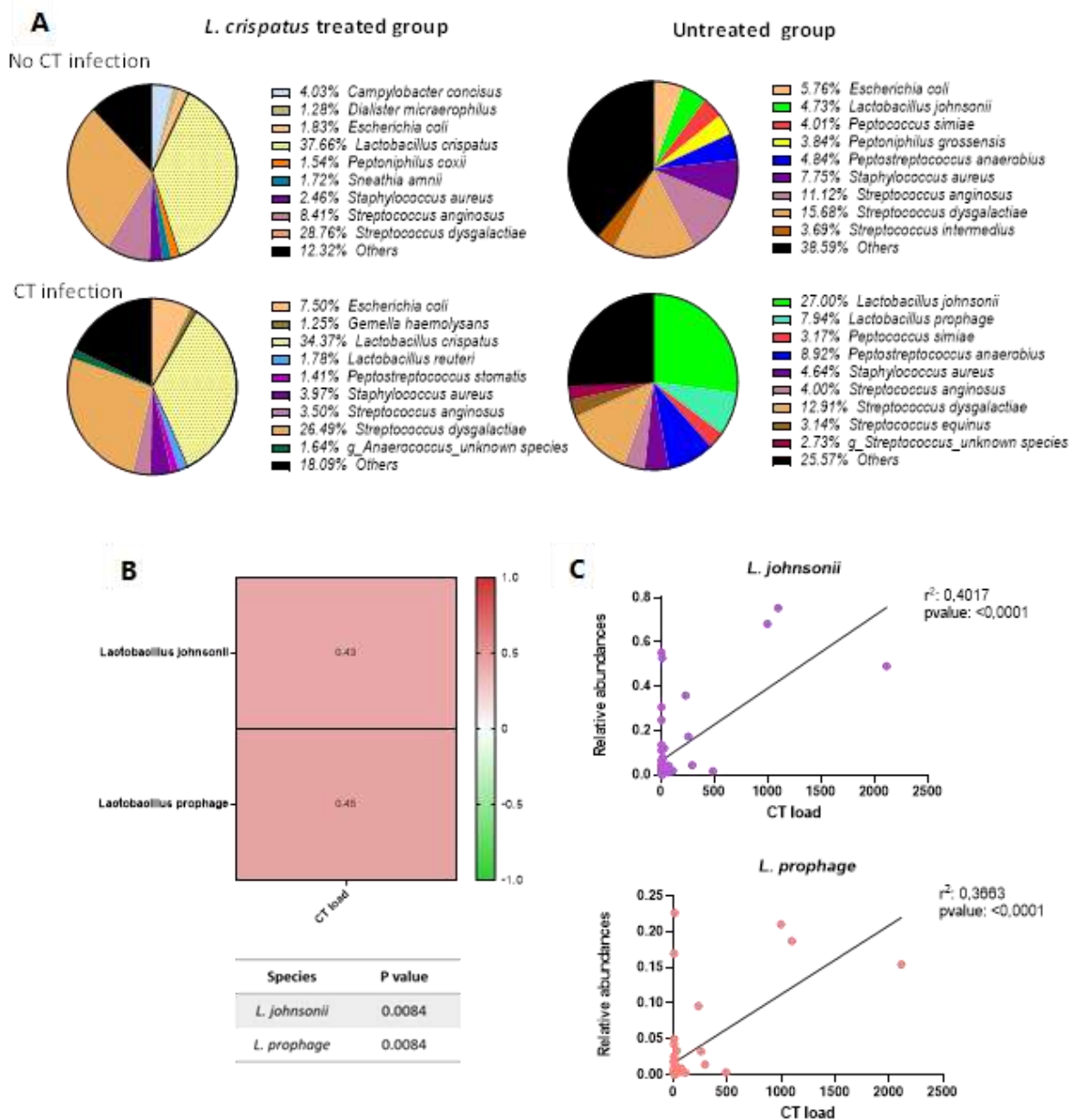


Figure 7: Association between species and CT infection. (A) Top 9 most represented species at CT inoculations that trigger a peak of CT load or not in *L. crispatus* treated animals (left) or untreated animals (right) are represented in pie chart. (B) Spearman correlation test was performed to determine association between *L. johnsonii* or *L. prophage* relative abundance and CT load. Heatmap representing the Spearman correlation coefficient was generated. Green represents negative association and red a positive association. A table with the p value obtained was also generated. (C) Simple linear regression was performed to compare the relative abundance of *L. johnsonii* or *L. prophage* with CT load. Goodness of fit is shown with r^2 .

(CT+) in all individuals. CT+ samples exhibited an increase abundance of many bacteria taxa including bacteria from the genus *Anaerococcus*, *Blautia* and *Succinivibrio* for instance [Fig8A; Suppl table 8]. Other bacteria were increased in some individuals during CT infection (*Peptostreptococcus spp.*, *Parvimonas spp.*). A second heatmap representing the log10 expression of bacterial taxa that are differentially abundant

before and after CT infection was generated [Fig8B; table 9]. After CT infection, there is an increased abundance of many bacterial taxa such as *Peptoniphilus spp.* and bacteria from the genus *Succinivibrio*, among others [Fig8B; Suppl Table 9]. CT infection might trigger significant modifications of the vaginal microbiota at the infection but also after CT infection.

Cytokines induced by CT infection were different according to groups and compartments

Cytokine and chemokine concentrations were measured in the serum from peripheral blood and in cervicovaginal fluids of all animals once a week throughout the study.

Cytokine concentration in peripheral blood

In peripheral blood serum, basal expression of IL1-RA, IL-2, IL-8, CCL2, CCL4, TGF α , VEGF and G-CSF were detected in each animal (Suppl Table 10). No significant differences were observed in terms of cytokine production between baseline and two weeks after antibiotic in all animals.

The impact of CT infection on peripheral blood cytokine concentration was then determined by comparing cytokine expression during CT inoculation but before CT infection, during CT infection and after CT infection (all samples collected after CT infection including samples during inoculation and follow up). No significant modification of cytokine expression within each group during CT infection was observed [Data not shown]. However, differences of cytokine concentration between groups were observed. CCL4, TGF α and IL-8 concentration was higher in untreated animal compared to *L. crispatus* treated animal during CT infection [Fig9A]. Subsequently, kinetics of cytokine concentration was analysed throughout the study. Heatmap representing median fold change of cytokine expression based on the concentration determined two days before CT inoculation was generated. Higher median expression of several cytokines was noticed in untreated compared to treated animals after CT infection [Suppl Fig7A]. Indeed, cytokine concentration (IFN γ , IL-1RA, IL-2, IL-10, IL-12/23, IL-15, CCL2, CCL4, CCL3, TGF α , TNF α and VEGF) were significantly higher in untreated animals compared to treated animals after CT infection [Fig9B]. These results demonstrate an increased cytokine production after CT infection in untreated animals compare to treated animals. This higher level of cytokines after CT infection can be partially attributed to two females, MF8 and MF9 [Suppl Fig8].

Cytokine expression in cervicovaginal fluids

Within cervicovaginal fluids, various cytokines including IL-1 β , IL-6, CCL2, G-CSF, IL-1RA, IL-8, IL-18 and VEGF, were detectable at baseline (Suppl Table 11).

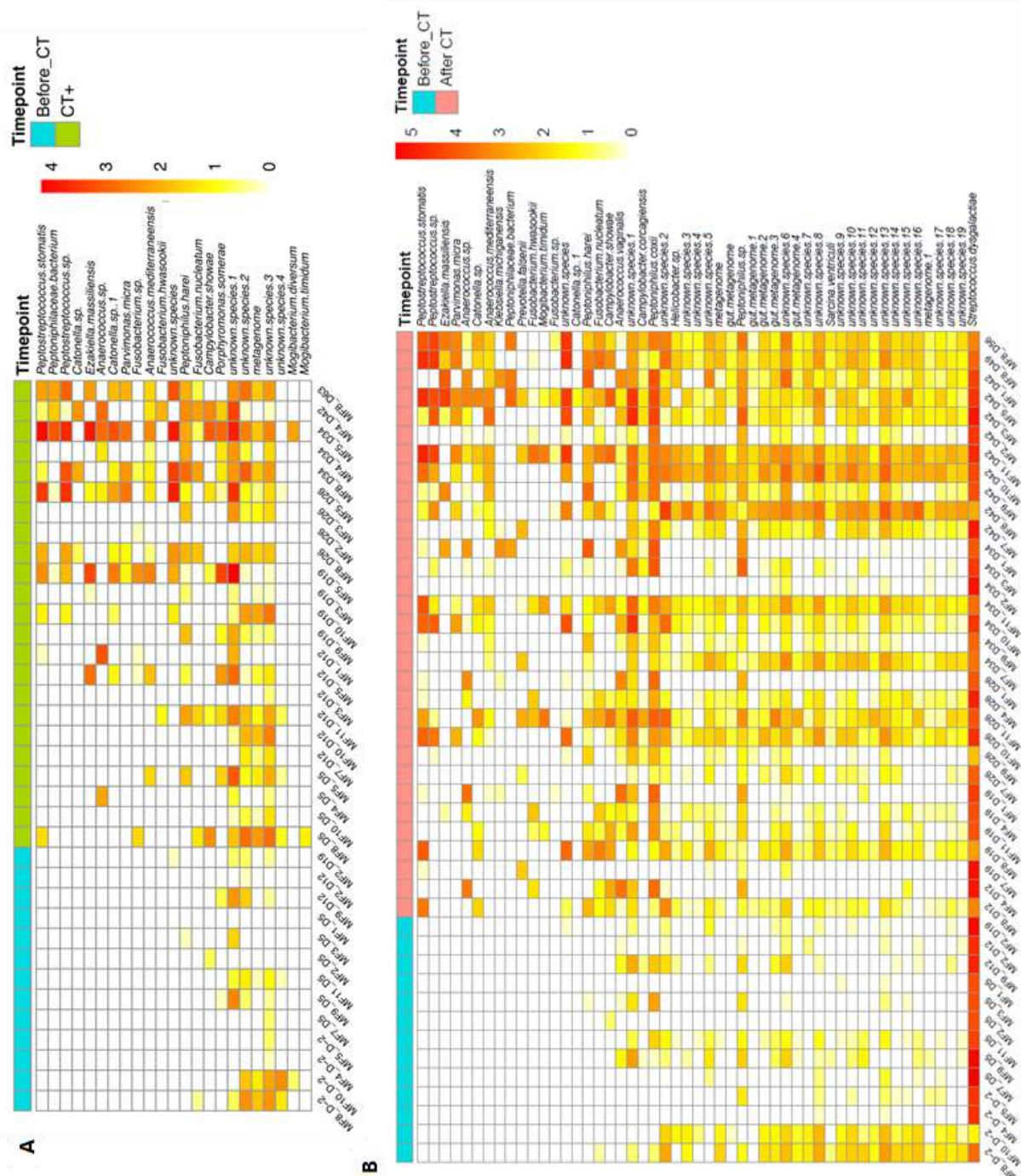


Figure 8: Variation of species at CT infection and after CT infection in all animals. A DEseq2 analysis was performed to evaluate differentially abundant species at the infection or after CT infection compared to before CT infection (in light blue). Heatmap representing the fold change after \log_{10} transformation of species increased or decreased in both conditions at CT infection (A, in green) and after CT infection (B, in red). The scale starts from 0 to above 4 or 5, red represents an increased abundance of the species. Species identification is on the right of the heatmap and sample ID on the bottom.

To study the effect of antibiotic treatments on cytokine concentration in cervicovaginal fluids, each concentration was compared to baseline value. In all analysis evaluating cervicovaginal cytokine production, samples collected during menstruation were excluded since we have previously shown [30] that during the menstruations

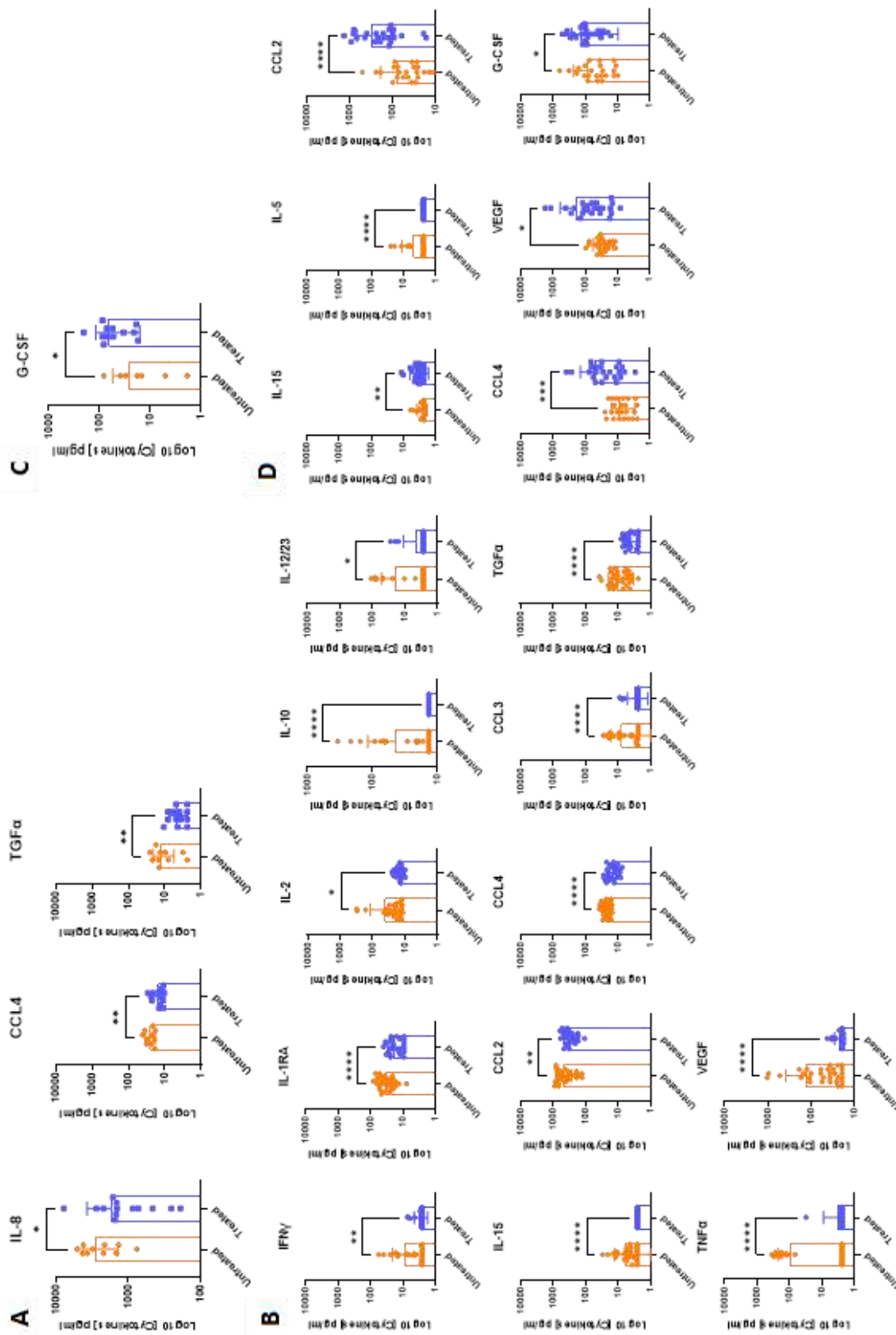


Figure 9: Peripheral blood and cervicovaginal cytokine concentrations. Log₁₀ cytokine concentrations in peripheral blood (A and B) and in cervicovaginal fluids (C and D) of untreated animals (orange) and *L. crispatus* treated (blue) animals during CT infection (A and C) or after CT infection (B and D). A Mann-Whitney test was performed to compare cytokine production between groups. Asterisks indicate a p value considered statistically significant (*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001).

cervicovaginal cytokine concentrations are increased. To study the local production of cytokines in each group throughout the study, a heatmap was generated, representing the median fold change expression for cytokines quantified after baseline, compared to the basal concentration [Suppl Fig7B]. Cytokine production was increased after metronidazole treatment compared to baseline [Suppl Fig7B] and this alteration was observed to be female specific [Data not shown]. No significant differences were observed according to metronidazole treatment, *L. crispatus* inoculation or CT infection. However, an increased expression of G-CSF was noticed in treated animals compared to the untreated during CT infection [Fig9C]. In addition, treated animals exhibited higher level of CCL2, G-CSF, VEGF, CCL4 and IL-15 after CT infection whereas untreated individuals had an increased expression of IL-5 compared to treated animal [Fig9D].

Overall, those results demonstrated an effect of antibiotic treatment on cytokine and chemokine concentrations. Moreover, CT infection induced higher cytokine expression in cervicovaginal fluids of treated compared to untreated animals.

Increase of mature and activated neutrophils after CT infection in peripheral blood but not in cervicovaginal cytobrushes

Neutrophil phenotype was performed on whole blood and on cervicovaginal cells at five time points: two baselines, after antibiotic treatment, one week after the six CT inoculations and four weeks after the six CT inoculations. In the blood, two populations were observed: CD11b⁺ CD101⁺ CD10⁺ CD32a⁺ and CD11b⁺ CD101⁺ CD10⁻ CD32a⁺ characterized as mature and immature subsets respectively [Fig10A]. Mean mature subset (Mean \pm SD) of baselines in the treated group represented 38.8% \pm 7.4 and the immature subset represented 58.4% \pm 6.9 of the total neutrophil populations. Similar percentages were observed in the untreated group (mature: 34% \pm 13.2; immature: 63% \pm 15). No impact of metronidazole treatment compared to baseline was noticed on neutrophil subpopulations [Fig10A]. In contrast, CT inoculations significantly increased the mature subset thus decreasing the immature one in both groups. Interestingly, for the treated group, these modifications were observed one week and four weeks after the six CT inoculations [Fig10A left]. On the contrary, the alteration of neutrophil subpopulations in the untreated group was significant only one week after the six CT inoculations [Fig10A right]. To study the expression of activation and maturation markers, the mean fluorescence intensity on total neutrophil populations was analysed and statistical analysis was determined based on the baseline [Fig10B]. CD101 expression was increased in both groups after metronidazole treatment and PD-L1 expression was decreased in untreated animals only. CD32a and HLA-DR

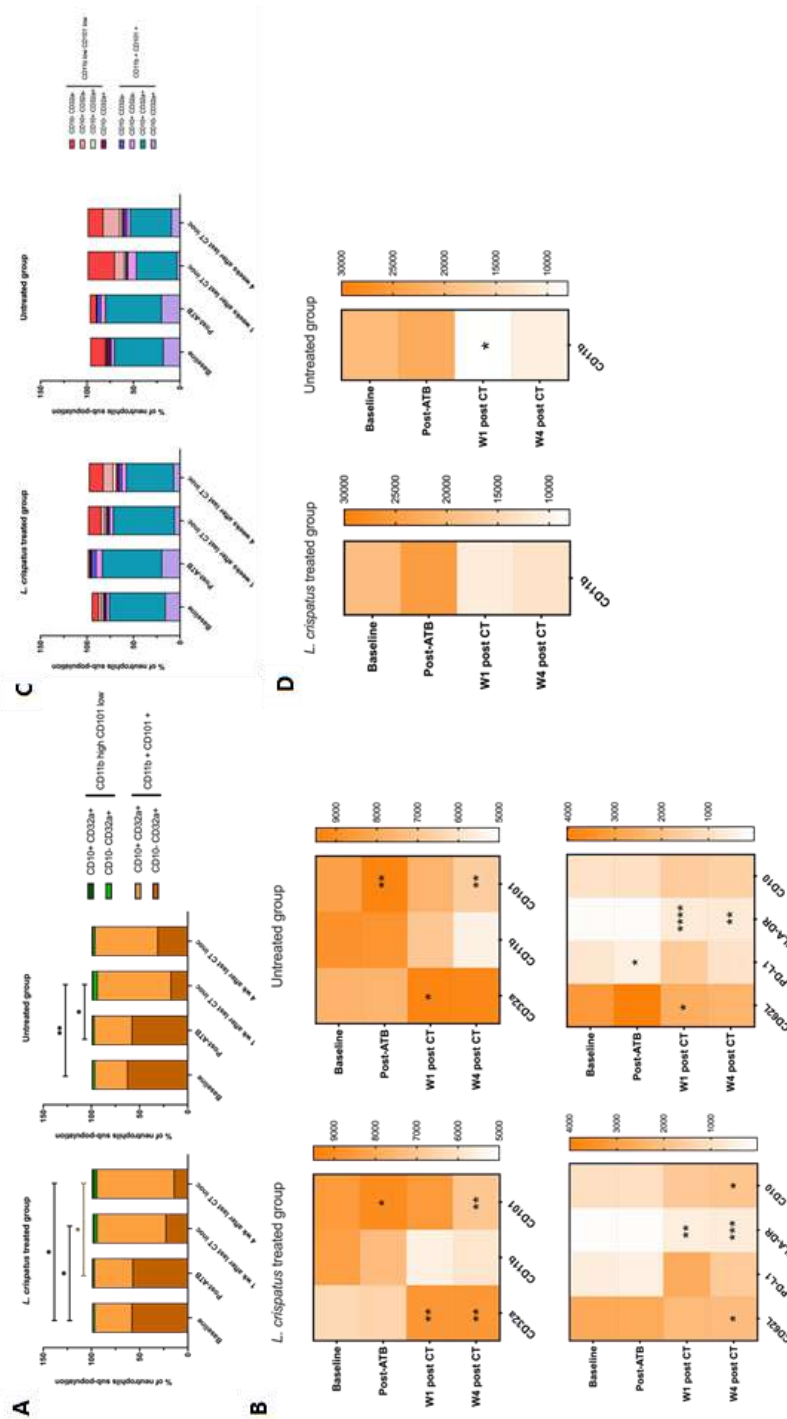


Figure 10: Neutrophil subpopulations and activation in peripheral blood and cervicovaginal cytobrushes. Percentage of neutrophil subpopulations among CD66⁺ Lin⁻ CD14⁺ in peripheral blood (A) and cervicovaginal cytobrushes (B) at baseline (the mean of the two baselines is represented), after metronidazole treatment or metronidazole treatment and *L. crispatus* inoculation (Post-ATB), one week after the last CT inoculation and four weeks after the last CT inoculation. A two way ANOVA test with the Turkey test to adjust p value was performed to compare baseline value to other time points. Asterisks indicate a p value considered statistically significant (*p ≤0.05, **p ≤0.01, ***p ≤0.001, ****p ≤0.0001). (B) Heatmap representing the mean fluorescence intensity (MFI) of CD32a, CD11b CD101 (top) or CD62L, PD-L1, HLA-DR, CD10 (bottom) on peripheral blood neutrophils (CD66⁺ Lin⁻ CD14⁺) at all time points. (D) A similar heatmap was generated for cervicovaginal neutrophils representing the MFI of CD11b. A two way ANOVA test with the Turkey test to adjust p value was performed to compare baseline value (mean of the two baselines) to other time points. Asterisks indicate a p value considered statistically significant (*p ≤0.05, **p ≤0.01, ***p ≤0.001, ****p ≤0.0001).

expression was significantly increased after CT inoculations whereas CD101 and CD62L expression was decreased. CD101 expression was decreased in both groups at four weeks after CT inoculations [Fig10B left and right]. Furthermore, HLA-DR expression was significantly increased in both group one and four weeks after CT inoculation [Fig10B left and right]. In *L. crispatus* treated animals, CD32a was increased at one and four weeks after CT inoculations whereas it was only at one week post CT inoculations for the untreated group [Fig10B left and right]. CD10 expression was significantly increased only in *L. crispatus* treated group at four weeks after CT inoculations. Finally, *L. crispatus* treated individuals exhibited a decreased expression of CD62L at four weeks

after CT inoculations whereas it was significantly decreased only at one week after CT inoculation in untreated animals [Fig10B left and right]. Overall, CT infection induced an accumulation of activated (CD32+, HLA-DR+) neutrophils in peripheral blood in both groups but maturation (CD10 expression) was increased only in *L. crispatus* treated group. Interestingly, the activation status (CD32a expression) of neutrophils last longer in treated animal compared to untreated animals.

In cervicovaginal cytobrushes, three main subsets of neutrophils were observed: CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁺ CD32⁺ (population 1); CD11b^{high} CD101⁺ CD10⁻ CD32⁺ (population 2) and CD11b^{low} CD101^{low} CD10⁻ CD32a⁻ (population 3) [Fig10C]. In all analysis evaluating cervicovaginal neutrophil subpopulations, samples collected during menstruation were excluded since we have previously shown [30] that during the menstruation cervicovaginal neutrophil subpopulations are modified. Population 1 represents 60.2% ± 10.2, population 2: 16.3% ± 1.2, population 3: 6.8 ± 1.5 of total neutrophils at baselines in *L. crispatus* treated group. In the untreated group, population 1 represents 52.5% ± 7.8, population 2: 18.5 ± 3.8, and population 3: 15.5% ± 11 of total neutrophils at baselines. No significant impact neither of antibiotic treatment nor of CT inoculations was noticed on neutrophil subpopulations [Fig10C]. Moreover, very little impact was observed on surface marker expression after CT inoculations. Indeed, only a significant decrease of the mean fluorescence intensity of CD11b on the total number of neutrophils was observed in the untreated group (p value: 0.020) at one week after CT inoculation [Fig10D]. Moreover, no significant increase of neutrophils expressing activation markers including CD32a, HLA-DR and PD-L1 was noticed [Data not shown].

Discussion

During this study, we have analysed the impact of the vaginal microbiota composition on CT infection and on the cervicovaginal and peripheral blood inflammation in female cynomolgus macaques. Contraception has been described to modify the FRT environment [31, 32] therefore control of menstrual cycle by injecting hormone was not performed during this study. Progesterone concentration as well as menstrual bleeding was monitored and menstruation effect on the local compartment was taken into account for the analysis. We have observed that females with an *L. crispatus* enriched vaginal microbiota have a higher cervicovaginal cytokine production but a better control of the systemic inflammation as well as a higher specific anti-CT IgG production in peripheral blood.

A non-persisting CT infection was detected in ten animals out of twelve and two animals remained uninfected independently of their group affiliation. In the pig-tailed macaques, a single cervicovaginal infection of 10⁶ IFU allow the detection of CT during

9 weeks post-infection before clearing the infection [22]. We can assume that the infectious dose in the present study was not sufficient to induce a sustained CT infection. Concerning the two uninfected animals, there was one in each group. No particularities in their vaginal microbiota, as well as no anti-CT IgG production, and very few cytokine production in blood or locally were observed. Interestingly, the uninfected animal in the *L. crispatus* treated group had a higher T cell specific response (Th1 and Th17). Since no CT load was detected, both animals were removed from every analysis. For infected animals, the T cell specific response in the blood was mainly a Th1 response with IL-2, IFN γ and TNF α production where *L. crispatus* treated animals demonstrated a slightly higher cytokine production. In human, similar specific responses with IFN γ production have been described to be efficient to resolve genital tract infection with CT [33, 34]. IL-17A production was also detected in both groups of animals, but weaker compared to the Th1 cytokines. The production of IL-17A was also slightly higher in the *L. crispatus* treated group compared to the untreated. Vaccine induced Th1 but also Th17 T cells recruitment to the FRT were linked to protection against CT infection and pathology [25]. Moreover, a low production of IL-17A has been associated with protection, whereas a high production was linked to genital tract pathology [34]. During this study, the genital tract pathology was not evaluated.

We then studied the production of specific anti-CT antibodies in the serum of all animals. We described that animals treated with *L. crispatus* had a significantly higher level of specific IgG against CT compared to other animals. The bacterial load was not different according to group, suggesting that the impact observed on IgG production is not linked to the amplitude of the infection. A review on the relationship between antibodies and gut microbiota suggests that IgG plasmocytes are close to the lamina propria, allowing the passage of anti-commensal IgG in the blood [35]. The composition of the vaginal microbiota may influence the specific local immune response, inducing a better production of IgG locally that can enter the bloodstream. No anti-CT IgG quantification was made during CT inoculations in cervicovaginal fluids, and we did not detect anti-CT IgG production locally after CT inoculations (from one to four weeks after the last CT inoculation) [Data not shown]. CT reinfection was observed in some females that did not produce peripheral blood specific anti-CT IgG after a first peak of infection. These results demonstrate that animals cleared rapidly the infection and that specific antibodies have protected the animals against reinfection. In women, seropositivity was associated with a decrease in cervical bacterial burden but not endometrium bacterial burden [36].

We also characterized the vaginal microbiota throughout the whole study. Antibiotic treatment induced drastic modifications of the vaginal microbiota in all animals, and these modifications were animal specific. We described a higher abundance of

Staphylococcus aureus, *Streptococcus* and endogenous *Lactobacillus spp* for instance. The proportion of natural *Lactobacillus spp.* was higher in animals from the untreated group. In Rwandan women, BV treatment with metronidazole induced a cure rate of only 54.5% suggesting strong variabilities among women. They observed a higher concentration of *Lactobacillus spp* including *L. iners* mainly and no modification of the concentration of *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* and *Shigella* species was observed. However, they observed an increase relative abundance of pathobionts (*Proteobacteria*, *Streptococci*, *Enterococci*, *Spirochaetaceae*, *Listeria*, CT and *N. gonorrhoeae*) that seems to be associated with treatment failure [37]. *Lactobacillus spp.* abundance was studied throughout our study. *L. crispatus* was present only in treated animals whereas untreated animals had high abundance of *L. johnsonii* and *L. prophage*. Interestingly, *L. johnsonii* and *L. prophage* abundance increased during CT infection in untreated animal. Their relative abundance was positively associated with CT load. This result suggests that endogenous *Lactobacillus spp* in untreated cynomolgus macaques are associated with increase CT infection. *Lactobacillus spp.* are present in women vaginal microbiota and are associated with anti-inflammatory effect and protection against STI [16, 17, 38, 39]. *L. johnsonii* was described to restrain vaginal colonization by pathobionts and to have anti-inflammatory effect [40, 41]. However, a recent paper highlights different inflammatory properties of *Lactobacillus spp* strains depending if they were isolated from a *Lactobacillus spp* dominant vaginal microbiota or a dysbiotic vaginal microbiota [42]. Interestingly, *L. johnsonii* has been described to inhibit IDO1 *in vitro*, leading to a decrease concentration of kynurenine [43]. We hypothesise that *L. johnsonii* strain, presents in the vaginal microbiota of cynomolgus macaque, by inhibiting IDO1 might promote CT infection.

Cytokine and chemokine production was monitored once a week to evaluate local and systemic inflammation after CT infection. In peripheral blood serum, there was an increased production of cytokines after CT infection in the untreated group compared to the *L. crispatus* treated group. This result suggests a higher systemic inflammation in the untreated group compared to *L. crispatus* treated animal. In the untreated group, two animal MF8 and MF9 exhibited a higher production of cytokines after CT inoculations. Interestingly, these two animals had a weak or no anti-CT IgG production respectively. We can hypothesis that those animals were not able to clear control the infection. In cervical fluids of women suffering from upper genital tract infection or from fertility disorders there is an increase level of IL-6, IL-8, IL-10, IFN γ , CXCL10, TNF α , IL-17A, CXCL9, CXCL11, CCL4 and CXCL13 [7, 8]. And higher level of IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23, IL-13, TGF α and TNF α in cervicovaginal fluids of MF8 during animal follow up (day 49 and 56) were noticed [Suppl Fig7]. We supposed that this important increase production of cytokines in the peripheral blood serum might result from an upper tract

dissemination of CT. We could not verify this hypothesis in the two animals since no euthanasia was performed.

The analyses of cytokine production in cervicovaginal fluids demonstrated difference in *L. crispatus* and untreated groups before CT infection [Fig9C] suggesting an impact of *L. crispatus* treatment on cytokine production. Statistical analysis on cytokine production during baseline and after antibiotic treatment was also performed to compare both groups and confirmed that the differences between groups are not due to variabilities among animals [Data not shown]. No significant differences according to groups were noticed before *L. crispatus* treatment. In contrast to the blood, cervicovaginal cytokine production was increased after CT infection in treated animals compared to untreated animals suggesting a better stimulation of the immune response in treated animals compared to untreated. The increase of cytokine production in *L. crispatus* treated animals involved [Fig9D]: (1) chemokines (CCL2 and CCL4) involved in monocyte, lymphocyte and NK cell recruitment [44, 45]; (2) IL-15 involved in T and NK cell proliferation and activation [46, 47]; (3) growth factor including VEGF but also G-CSF, a key cytokine involved in neutrophil proliferation [48]. In terms of inflammation, neutrophil phenotype was studied in peripheral blood and in cervicovaginal cytobrushes. In peripheral blood, neutrophils were more mature and activated after CT infection in both groups, but the maturation and activation were sustained longer in the treated group compared to untreated. In cervicovaginal cytobrushes, no impact on maturation or activation was noticed in contrast to peripheral blood neutrophils. Sampling was performed only after the six CT inoculations, to avoid inflammation induced by repeated cervicovaginal cytobrushes. Therefore, the accumulation/activation or maturation of neutrophils might have been missed and only a more tardive immune response in the blood compartment could be seen. However, a decrease in CD11b on total neutrophils was observed after CT infection in the untreated group and no modification was noticed in the *L. crispatus* treated group. CD11b is an integrin family member expresses in many cells including neutrophils. Its increase in the blood has been associated with neutrophil priming as well as CD62L shedding [27]. Several hypothesis could be made for the decrease of CD11b and/or absence of CD11b increase: (1) It could be a tissue specific phenotype since no information on CD11b expression on neutrophils after CT infection is documented; (2) neutrophil phenotyping was performed one and four weeks after CT infection so we might have missed the increase of CD11b expression on local neutrophils; (3) it could be resident neutrophils with increase survival that might have lost the expression of some markers including CD11b. This is the first study describing neutrophils in peripheral blood and cervicovaginal cytobrushes in a context of CT infection.

Overall, this study demonstrates that female cynomolgus macaques with a *L. crispatus* enriched vaginal microbiota developed a better specific antibody response against CT in peripheral blood compared to *L. crispatus* untreated animal. Moreover, the increase presence of *L. johnsonii* in untreated animals, after metronidazole treatment, is associated with higher bacterial load thus a higher CT susceptibility. We were not able to link an increased production of cytokines with *L. johnsonii* abundance. However, we could observe a higher systemic production of cytokines in untreated animal compared to treated animal. In contrary, treated animal have an increase production of cervicovaginal cytokines after CT infection compared to untreated animal suggesting a better local immune response. Our study has some limitations. Significant inter-individual differences enable us to evaluate the effect of a specific vaginal microbiota on CT infection, therefore a higher number of animals should be investigated for further studies. This animal model was able to reproduce an asymptomatic CT infection observed in women, but it would be interesting to evaluate the impact of the vaginal microbiota composition on a sustained infection *ie* inflammation. In conclusion, this study demonstrates a significant impact of the vaginal microbiota composition on the local and systemic immune response induced by CT infection. It highlights a need for a better understanding of the effect of vaginal microbiota composition on STI acquisition.

Acknowledgments:

The authors would like to thank all members of the ASW (Raphaël Ho Tsong Fang; Jean-Marie Robert, Sebastien Langlois, Maxime Potier, Quentin Sconosciuti, Nina Dhooge), L2I (Laetitia Bossevot, Julie Morin) and LFC (Jerôme Van Wassenhove, Mario Gomez-Pacheco) teams of the IDMIT infrastructure as well as the members of the Animalliance group (Thierry Prot, Marjorie Benfissa). The authors also would like to thank Dr Agathe Subtil for the discussion surrounding this project and Dr Frank Follmann as well as his team in Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark) for their help and for providing us the strain of CT used for the infection.

Bibliography

1. Sexually transmitted infections (STIs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)). Accessed 13 Sep 2021.
2. Murthy AK, Li W, Ramsey KH. Immunopathogenesis of Chlamydial Infections. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018;412:183–215.
3. Ziklo N, Huston WM, Hocking JS, Timms P. Chlamydia trachomatis Genital Tract Infections: When Host Immune Response and the Microbiome Collide. *Trends Microbiol*. 2016;24:750–65.
4. Geisler WM, Lensing SY, Press CG, Hook EW. Spontaneous Resolution of Genital Chlamydia trachomatis Infection in Women and Protection from Reinfection. *J Infect Dis*. 2013;207:1850–6.

5. Walker J, Tabrizi SN, Fairley CK, Chen MY, Bradshaw CS, Twin J, et al. Chlamydia trachomatis Incidence and Re-Infection among Young Women – Behavioural and Microbiological Characteristics. PLoS One. 2012;7.
6. Spear GT, Kendrick SR, Chen HY, Thomas TT, Bahk M, Balderas R, et al. Multiplex Immunoassay of Lower Genital Tract Mucosal Fluid from Women Attending an Urban STD Clinic Shows Broadly Increased IL1 β and Lactoferrin. PLOS ONE. 2011;6:e19560.
7. Poston TB, Lee DE, Darville T, Zhong W, Dong L, O'Connell CM, et al. Cervical Cytokines Associated With Chlamydia trachomatis Susceptibility and Protection. J Infect Dis. 2019;220:330–9.
8. Agrawal T, Vats V, Salhan S, Mittal A. The mucosal immune response to Chlamydia trachomatis infection of the reproductive tract in women. Journal of Reproductive Immunology. 2009;83:173–8.
9. Lu H, Shen C, Brunham RC. Chlamydia trachomatis Infection of Epithelial Cells Induces the Activation of Caspase-1 and Release of Mature IL-18. The Journal of Immunology. 2000;165:1463–9.
10. Buckner LR, Lewis ME, Greene SJ, Foster TP, Quayle AJ. Chlamydia trachomatis infection results in a modest pro-inflammatory cytokine response and a decrease in T cell chemokine secretion in human polarized endocervical epithelial cells. Cytokine. 2013;63:151–65.
11. Lijek RS, Helble JD, Olive AJ, Seiger KW, Starnbach MN. Pathology after Chlamydia trachomatis infection is driven by nonprotective immune cells that are distinct from protective populations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115:2216–21.
12. Lehr S, Vier J, Häcker G, Kirschnek S. Activation of neutrophils by Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is modulated by the chlamydial plasmid. Microbes and Infection. 2018;20:284–92.
13. Naglak EK, Morrison SG, Morrison RP. Neutrophils Are Central to Antibody-Mediated Protection against Genital Chlamydia. Infect Immun. 2017;85.
14. Ziklo N, Vidgen ME, Taing K, Huston WM, Timms P. Dysbiosis of the Vaginal Microbiota and Higher Vaginal Kynurenine/Tryptophan Ratio Reveals an Association with Chlamydia trachomatis Genital Infections. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8.
15. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108 Suppl 1:4680–7.
16. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UME, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. Sci Transl Med. 2012;4:132ra52.
17. Balle C, Lennard K, Dabee S, Barnabas SL, Jaumdally SZ, Gasper MA, et al. Endocervical and vaginal microbiota in South African adolescents with asymptomatic Chlamydia trachomatis infection. Sci Rep. 2018;8.
18. Nardini P, Ñahui Palomino RA, Parolin C, Laghi L, Foschi C, Cevenini R, et al. Lactobacillus crispatus inhibits the infectivity of Chlamydia trachomatis elementary bodies, in vitro study. Sci Rep. 2016;6.
19. Boyd KL, Muehlenbachs A, Rendi MH, Garcia RL, Gibson-Corley KN. Female Reproductive System. In: Comparative Anatomy and Histology. Elsevier; 2018. p. 303–34.
20. Van Esch E, Cline JM, Buse E, Wood CE, de Rijk EPCT, Weinbauer GF. Summary Comparison of Female Reproductive System in Human and the Cynomolgus Monkey (Macaca fascicularis). Toxicol Pathol. 2008;36 7_suppl:171S-172S.
21. Marlin R, Nugyre M-T, Tchitchek N, Parenti M, Hocini H, Benjelloun F, et al. Modified Vaccinia Virus Ankara Vector Induces Specific Cellular and Humoral Responses in the Female Reproductive Tract, the Main HIV Portal of Entry. J Immunol. 2017;199:1923–32.
22. Patton DL, Sweeney YC, Baldessari AE, Cles L, Kari L, Sturdevant GL, et al. The Chlamydia trachomatis Plasmid and CT135 Virulence Factors Are Not Essential for Genital Tract Infection or Pathology in Female Pig-Tailed Macaques. Infect Immun. 2018;86.

23. Le Grand R, Dereuddre-Bosquet N, Dispinseri S, Gosse L, Desjardins D, Shen X, et al. Superior Efficacy of a Human Immunodeficiency Virus Vaccine Combined with Antiretroviral Prevention in Simian-Human Immunodeficiency Virus-Challenged Nonhuman Primates. *J Virol.* 2016;90:5315–28.
24. Nugeyre M-T, Tchitchek N, Adapen C, Cannou C, Contreras V, Benjelloun F, et al. Dynamics of Vaginal and Rectal Microbiota Over Several Menstrual Cycles in Female Cynomolgus Macaques. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9.
25. Nguyen NDNT, Olsen AW, Lorenzen E, Andersen P, Hvid M, Follmann F, et al. Parenteral vaccination protects against transcervical infection with *Chlamydia trachomatis* and generate tissue-resident T cells post-challenge. *NPJ Vaccines.* 2020;5:7.
26. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29:297–301.
27. Condliffe AM, Chilvers ER, Haslett C, Dransfield I. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. *Immunology.* 1996;89:105–11.
28. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics.* 2018;34:1287–94.
29. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550.
30. Adapen C, Réot L, Nunez N, Cannou C, Marlin R, Lemaître J, et al. Local Innate Markers and Vaginal Microbiota Composition Are Influenced by Hormonal Cycle Phases. *Front Immunol.* 2022;13:841723.
31. Balle C, Konstantinus IN, Jaumdally SZ, Havyarimana E, Lennard K, Esra R, et al. Hormonal contraception alters vaginal microbiota and cytokines in South African adolescents in a randomized trial. *Nat Commun.* 2020;11.
32. Edfeldt G, Lajoie J, Röhl M, Oyugi J, Åhlberg A, Khalilzadeh-Binicy B, et al. Regular Use of Depot Medroxyprogesterone Acetate Causes Thinning of the Superficial Lining and Apical Distribution of Human Immunodeficiency Virus Target Cells in the Human Ectocervix. *The Journal of Infectious Diseases.* 2020. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa514>.
33. Cotter TW, Ramsey KH, Miranpuri GS, Poulsen CE, Byrne GI. Dissemination of *Chlamydia trachomatis* chronic genital tract infection in gamma interferon gene knockout mice. *Infect Immun.* 1997;65:2145–52.
34. O'Meara CP, Armitage CW, Harvie MC, Andrew DW, Timms P, Lycke NY, et al. Immunity against a *Chlamydia* infection and disease may be determined by a balance of IL-17 signaling. *Immunology & Cell Biology.* 2014;92:287–97.
35. Sterlin D, Fadlallah J, Slack E, Gorochov G. The antibody/microbiota interface in health and disease. *Mucosal Immunology.* 2020;13:3–11.
36. Russell AN, Zheng X, O'Connell CM, Taylor BD, Wiesenfeld HC, Hillier SL, et al. Analysis of Factors Driving Incident and Ascending Infection and the Role of Serum Antibody in *Chlamydia trachomatis* Genital Tract Infection. *J Infect Dis.* 2016;213:523–31.
37. Verwijs MC, Agaba SK, Darby AC, van de Wijgert JHHM. Impact of Oral Metronidazole Treatment on the Vaginal Microbiota and Correlates of Treatment Failure. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.08.008>.
38. Mehta O, Ghosh TS, Kothidar A, Gowtham MR, Mitra R, Kshetrapal P, et al. Vaginal Microbiome of Pregnant Indian Women: Insights into the Genome of Dominant *Lactobacillus* Species. *Microbial Ecology.* 2020;80:487–99.
39. Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, Bowman BA, Yamamoto HS, Soumillon M, et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity.*

2015;42:965–76.

40. Teixeira GS, Carvalho FP, Arantes RME, Nunes AC, Moreira JLS, Mendonça M, et al. Characteristics of *Lactobacillus* and *Gardnerella vaginalis* from women with or without bacterial vaginosis and their relationships in gnotobiotic mice. *J Med Microbiol.* 2012;61 Pt 8:1074–81.

41. Bereswill S, Ekmekciü I, Escher U, Fiebiger U, Stingl K, Heimesaat MM. *Lactobacillus johnsonii* ameliorates intestinal, extra-intestinal and systemic pro-inflammatory immune responses following murine *Campylobacter jejuni* infection. *Sci Rep.* 2017;7:2138.

42. Manhanzva MT, Abrahams AG, Gamielidien H, Froissart R, Jaspan H, Jaumdally SZ, et al. Inflammatory and antimicrobial properties differ between vaginal *Lactobacillus* isolates from South African women with non-optimal versus optimal microbiota. *Sci Rep.* 2020;10.

43. Valladares R, Bojilova L, Potts AH, Cameron E, Gardner C, Lorca G, et al. *Lactobacillus johnsonii* inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase and alters tryptophan metabolite levels in BioBreeding rats. *FASEB J.* 2013;27:1711–20.

44. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front Immunol.* 2019;10:2759.

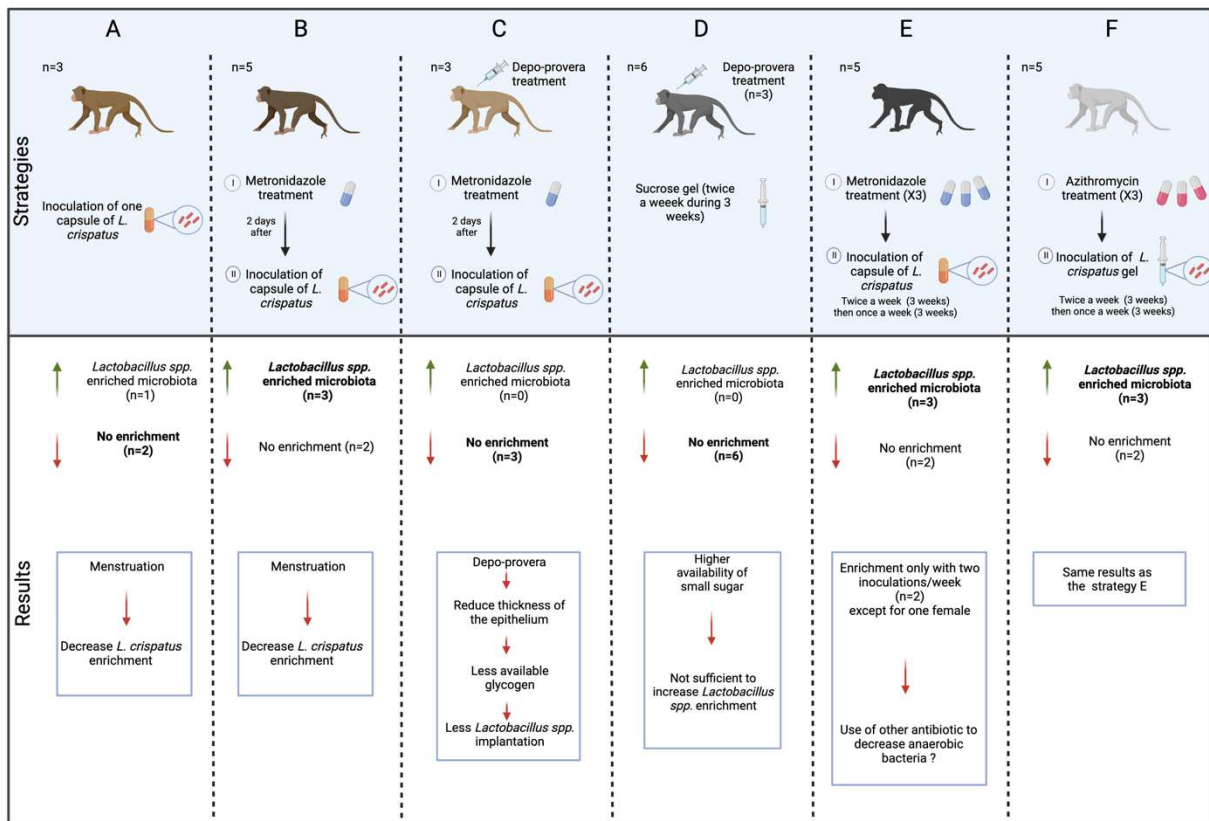
45. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2004;36:1882–6.

46. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med.* 2009;206:25–34.

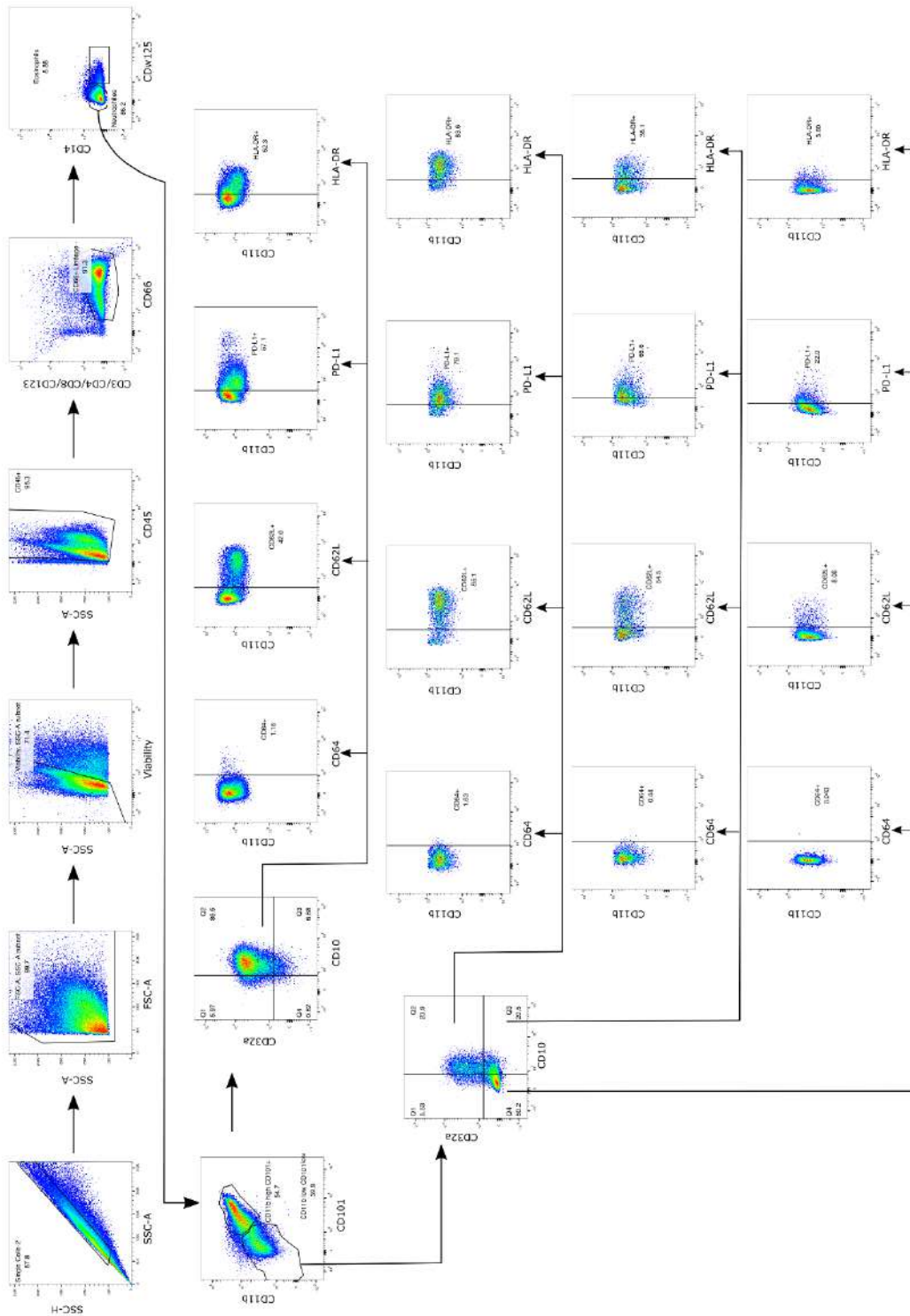
47. Schluns KS, Williams K, Ma A, Zheng XX, Lefrançois L. Cutting Edge: Requirement for IL-15 in the Generation of Primary and Memory Antigen-Specific CD8 T Cells. *The Journal of Immunology.* 2002;168:4827–31.

48. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor. *Blood.* 1991;78:2791–808.

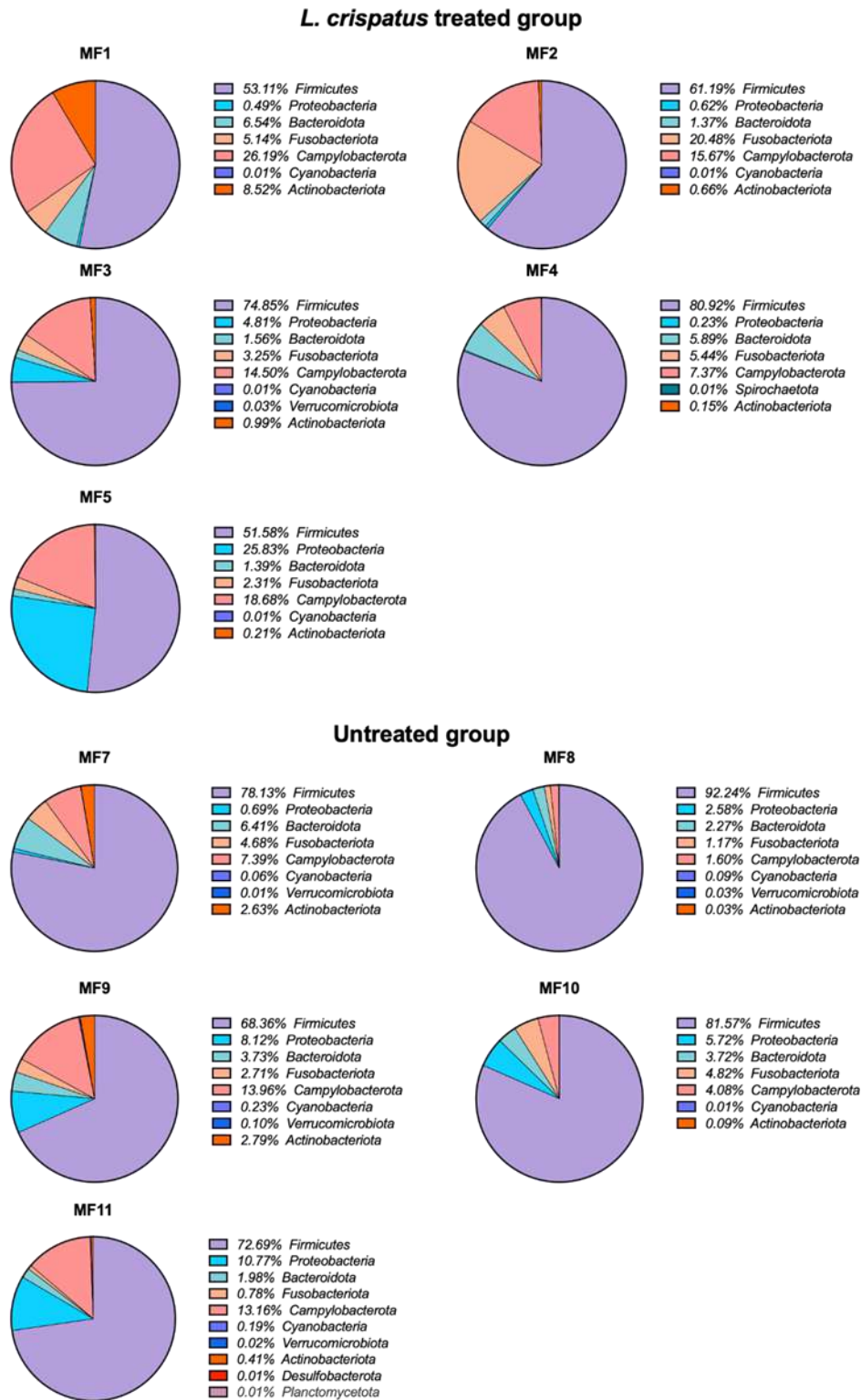
Supplementary figures



Supplementary figure 1: Strategies tested to enrich the vaginal microbiota with *L. crispatus*. Several protocols were tested to induce the enrichment of exogenous *Lactobacillus* spp. in five female cynomolgus macaques : (A) A single inoculation of a capsule of *L. crispatus* (Physioflor LP®; IPRAD PHARMA, Paris) ; (B) A single pretreatment with metronidazole two days before the inoculation of *L. crispatus* capsule; (C) Depo-provera® intra-muscular injection (30mg) one month before metronidazole pretreatment two days before the inoculation of *L. crispatus* capsule (Physioflor LP®; IPRAD PHARMA, Paris); (D) Depo-provera® intra-muscular injection (30mg) in 3 animals out of 6, one month before repeated sucrose gel inoculations; (E) Repeated treatments of metronidazole before repeated inoculations of *L. crispatus* capsule (Physioflor LP®; IPRAD PHARMA, Paris); (F) Repeated treatments of azithromycin before repeated inoculations of *L. crispatus* gel. Menstruation and Depo-provera injections reduced the enrichment of *L. crispatus*. However, repeated pretreatments with metronidazole or azithromycin followed by repeated inoculations of *L. crispatus* induced a higher rate of *L. crispatus* enrichment. Created with Biorender.com.

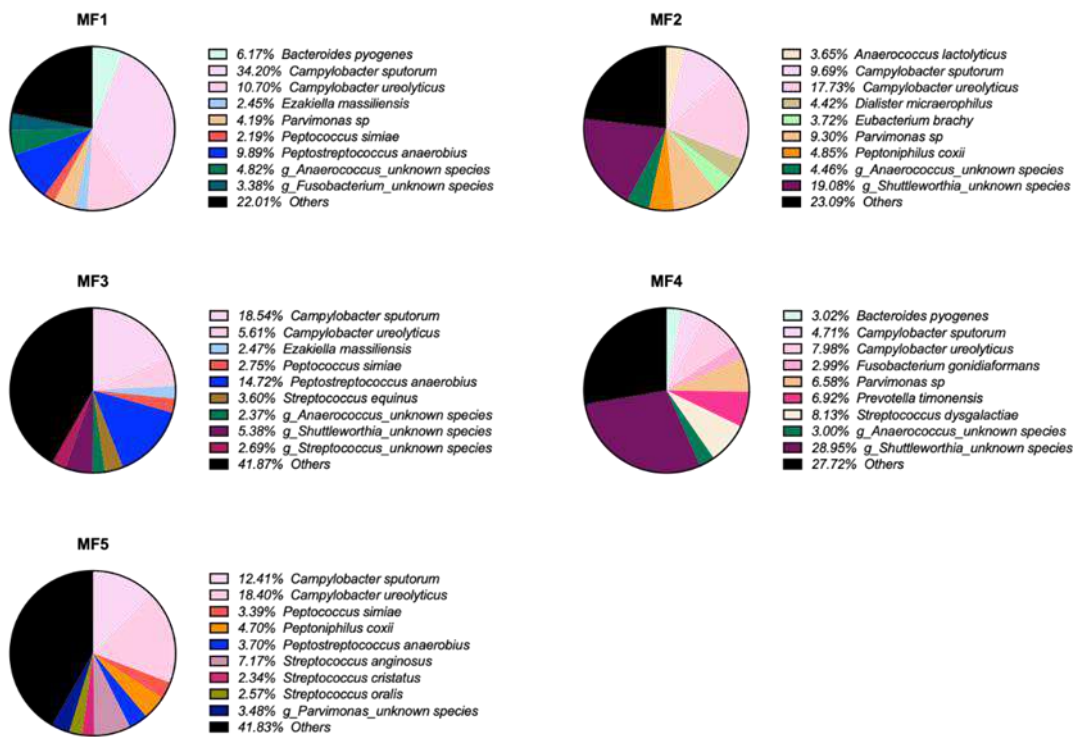


Supplementary figure 2: FACS gating strategy for neutrophil phenotyping in cervicovaginal cytobrushes.

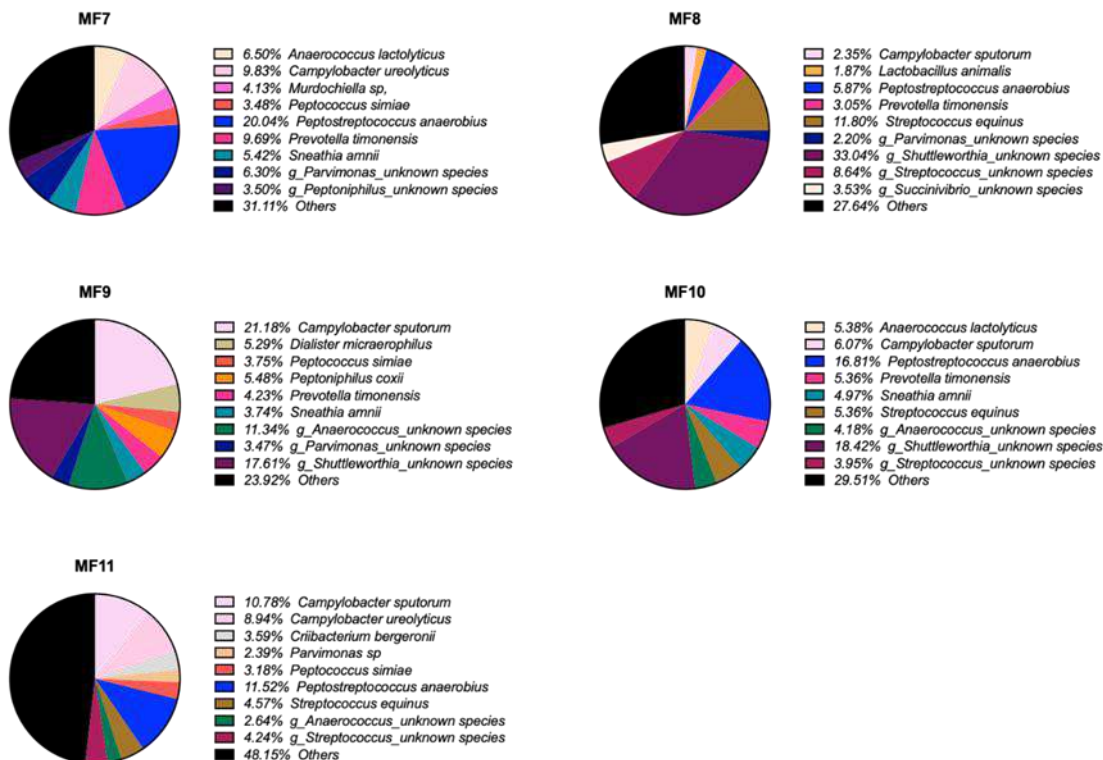


Supplementary figure 3: Vaginal microbiota composition at the phylum level of *L. crispatus* treated animals (top) and untreated animals (bottom) at baseline. Percentage of mean relative abundances of phylum are represented in pie chart for each animal.

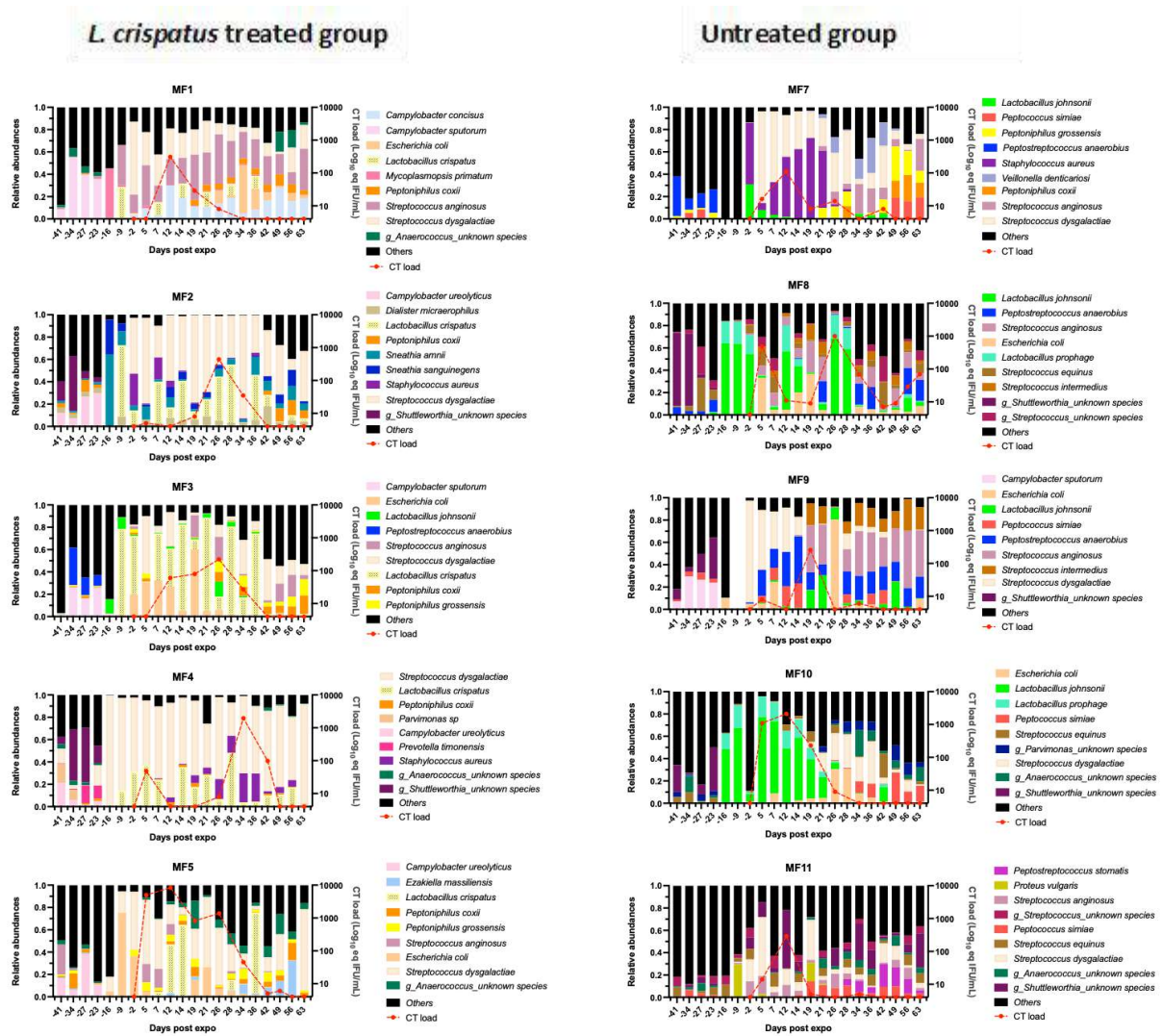
***L. crispatus* treated group**



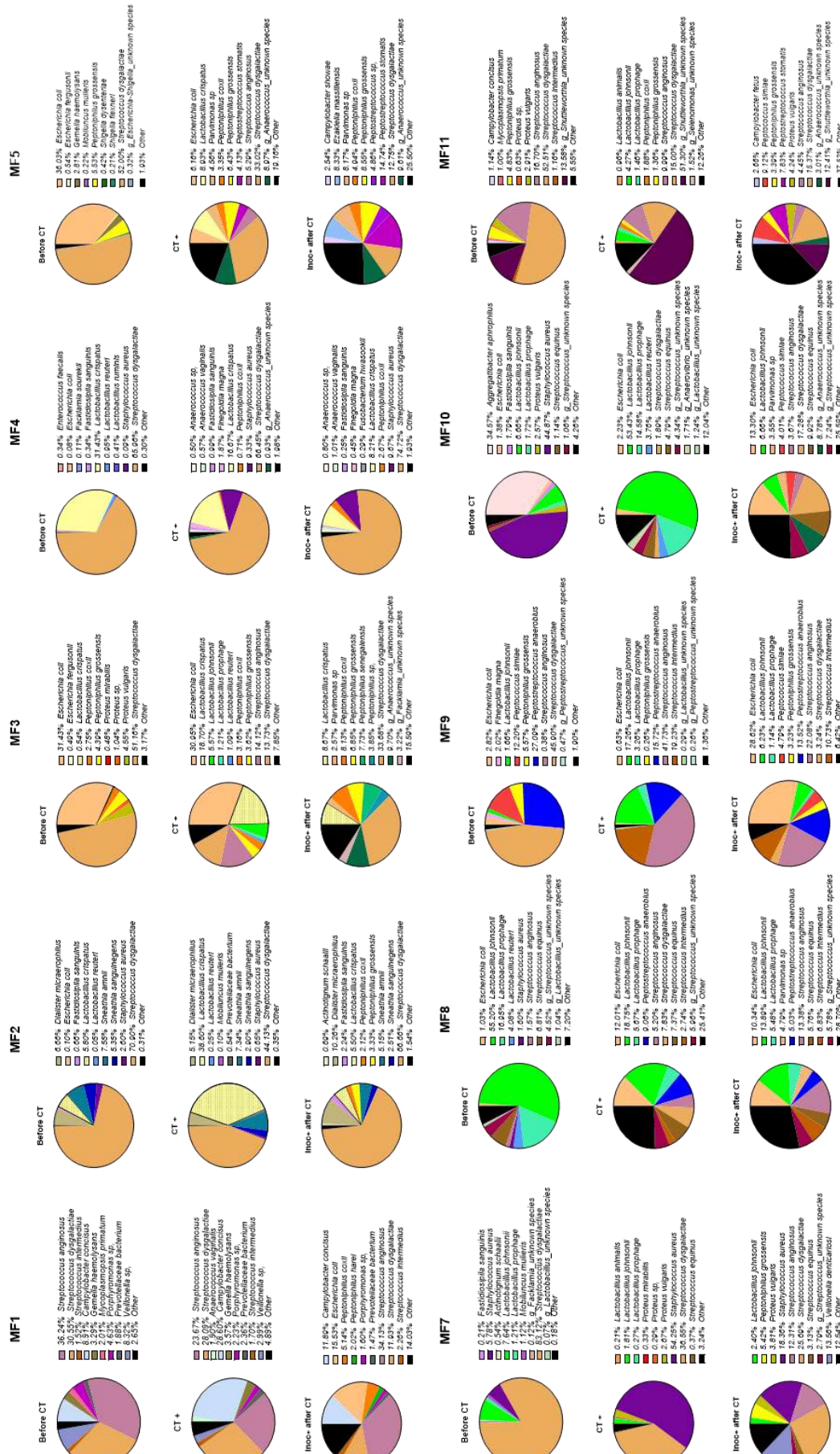
Untreated group



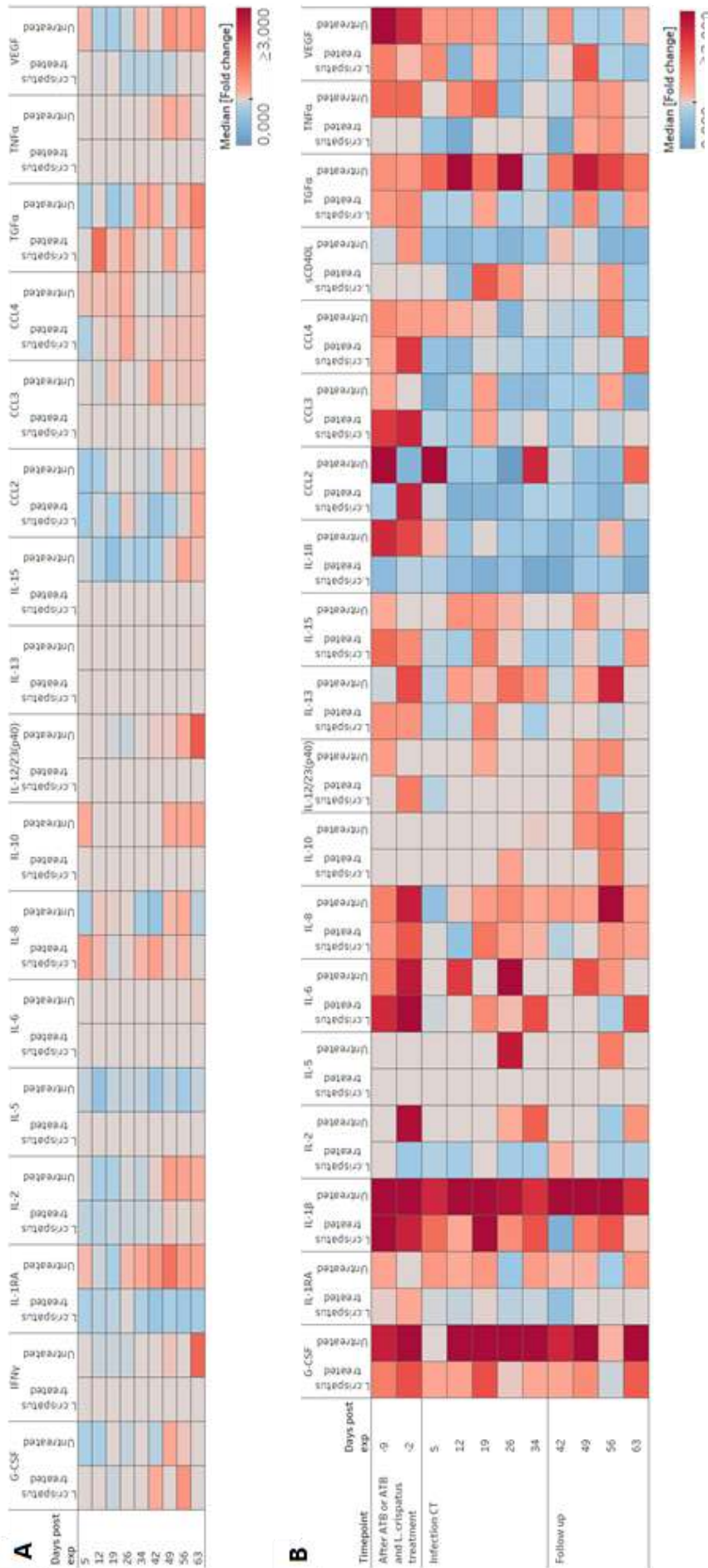
Supplementary figure 4: Vaginal microbiota composition at the species level of *L. crispatus* treated animals (top) and untreated animals (bottom) at baseline. Percentage of mean relative abundances of the top 9 most represented species in each animal are represented in pie chart.



Supplementary figure 5: Vaginal microbiota composition at the species level of *L. crispatus* treated animals (left) and untreated animals (right) throughout the study. Percentage of relative abundances of the top 9 most represented species in each animal are represented in bar plot. A red dotted line represents CT load in each animal.

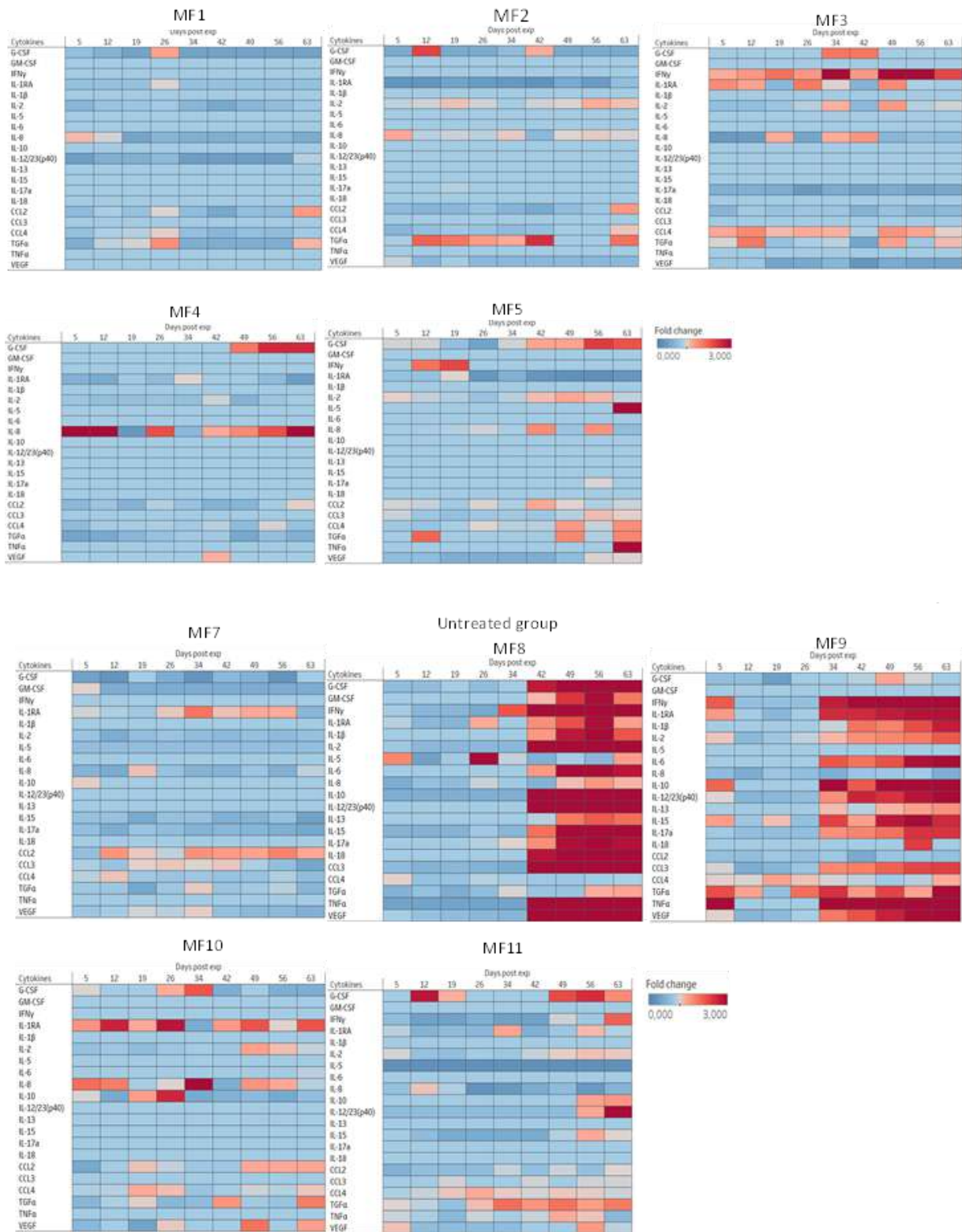


Supplementary figure 6: Alteration of the vaginal microbiota composition by CT infection in each animal. Pie chart representing the top 9 most represented species in each animal before CT infection (before CT), at the infection (CT+) and after CT infection when no bacterial load is detected (inoc + after CT) in the *L. crispatus* treated group (top) and in the untreated group (bottom).



Supplementary figure 7: Cytokine concentrations in peripheral blood (A) and cervicovaginal fluids (B). Heatmap representing the median fold change of cytokines and chemokines in peripheral blood serum (A) and cervicovaginal fluids (B) in *L. crispatus* animals and untreated animals throughout the study. The fold change was calculated based on the expression of each cytokine/chemokine for each female at baseline. Red indicates an increased fold change and blue a decrease.

L. crispatus treated group



Supplementary figure 8: Peripheral blood cytokine concentrations in each animal. Heatmap representing the fold change of cytokines and chemokines in peripheral blood serum in each animal throughout the study. The fold change was calculated based on the expression of each cytokine/chemokine for each female at baselines. Red indicates an increased fold change and blue a decrease.

Annexe 3 : Revue 2

« Neonatal Immune System Ontogeny: The Role of Maternal Microbiota and Associated Factors. How Might the Non-Human Primate Model Enlighten the Path? »

Revue publiée dans Vaccines. 2021, 9, 584.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9060584>

Review

Neonatal Immune System Ontogeny: The Role of Maternal Microbiota and Associated Factors. How Might the Non-Human Primate Model Enlighten the Path?

Natalia Nunez ^{1,†} , Louis Réot ¹  and Elisabeth Menu ^{1,2,*}

¹ CEA, Université Paris-Sud, Inserm, U1184 “Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases” (IMVA-HB), IDMIT Department, IBFJ, 92265 Fontenay-aux-Roses, France; nnunez@lifeandsoft.com (N.N.); louis.reot@cea.fr (L.R.)

² MISTIC Group, Department of Virology, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

* Correspondence: elisabeth.menu@cea.fr

† Present address: Life & Soft, 92060 Plessis-Robinson, France.

Abstract: Interactions between the immune system and the microbiome play a crucial role on the human health. These interactions start in the prenatal period and are critical for the maturation of the immune system in newborns and infants. Several factors influence the composition of the infant’s microbiota and subsequently the development of the immune system. They include maternal infection, antibiotic treatment, environmental exposure, mode of delivery, breastfeeding, and food introduction. In this review, we focus on the ontogeny of the immune system and its association to microbial colonization from conception to food diversification. In this context, we give an overview of the mother–fetus interactions during pregnancy, the impact of the time of birth and the mode of delivery, the neonate gastrointestinal colonization and the role of breastfeeding, weaning, and food diversification. We further review the impact of the vaccination on the infant’s microbiota and the reciprocal case. Finally, we discuss several potential therapeutic interventions that might help to improve the newborn and infant’s health and their responses to vaccination. Throughout the review, we underline the main scientific questions that are left to be answered and how the non-human primate model could help enlighten the path.

Keywords: microbiota; immune system maturation; colonization; non-human primate; pregnancy; birth; breastfeeding; weaning; vaccination; probiotics



Citation: Nunez, N.; Réot, L.; Menu, E. Neonatal Immune System Ontogeny: The Role of Maternal Microbiota and Associated Factors. How Might the Non-Human Primate Model Enlighten the Path? *Vaccines* **2021**, *9*, 584. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060584>

Academic Editor: François Meurens

Received: 30 March 2021

Accepted: 28 May 2021

Published: 1 June 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mammal commensal microbes colonize most of their host’s surfaces including the skin and the mucosa. Neonatal microbial colonization depends on several factors that include, among others, the delivery mode, the environment, feeding, weaning timing, and antibiotic use (Figure 1a). The exposure of the newborn to microbial antigens facilitates the development and maturation of the immune system. In fact, the ontogenesis of the immune system begins as early as three weeks after conception and this process continues after birth and into childhood [1].

The mother’s microbiotas (vaginal, perineal, and intestinal) are among the initial factors shaping newborn colonization. Surprisingly, the impact of a mother’s dysbiotic microbiota on the child’s health outcome is still matter of study. The disruption of the microbiota colonization during the neonatal period and in early childhood has been linked to several chronic pathologies, which include obesity, asthma, and autoimmune diseases [2]. It is thus of great importance to dissect the association in the mother–newborn interphase. The hygiene hypothesis stipulates an association between low exposure to microorganisms in childhood and a high risk of autoimmune diseases and atopy [3].

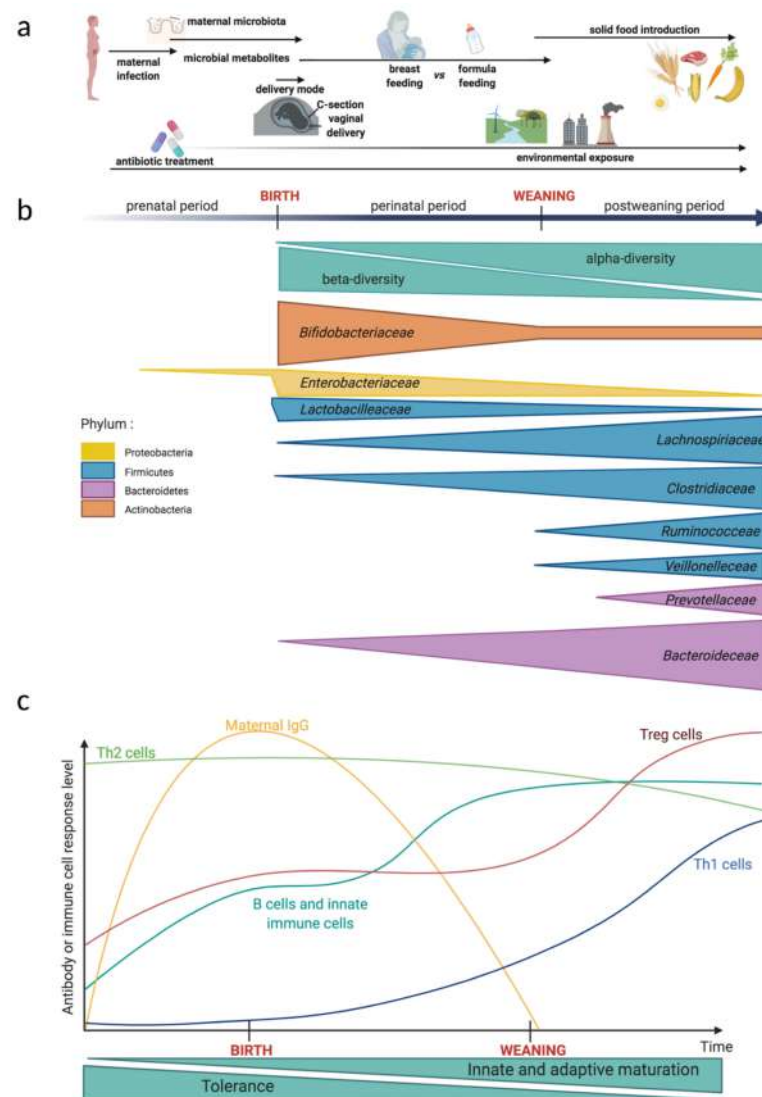


Figure 1. Kinetics of the local environment impact, the gut microbiota evolution, and the immune system maturation from fetal development to the neonatal period. (a) Factors affecting the evolution of the microbiota and the immune system. During the prenatal period and even after birth, maternal infection and antibiotic treatment disturbs fetal development. After birth, the gut microbiota and the development of the immune system are both influenced by environmental exposure. The mode of delivery and feeding impacts the colonization of the neonatal intestinal mucosa. Around weaning, the timing of solid food introduction and the composition of the diet determines the gut microbiota dynamics and the immune system maturation. (b) Evolution during the prenatal period and early childhood of the main bacteria families in the gut microbiota. The size of each triangle reflects the relative abundance of each bacteria family or the bacterial richness. Fetal colonization is still a matter of debate. Neonate gut presents a reduced microbial diversity at an individual level (α -diversity) but a high variation of microbial communities when compared between individuals (β -diversity). After weaning, the α -diversity strongly increases and the gut microbiota becomes more resilient. In this figure, bacteria belonging to the same phylum are grouped in the same color. (c) Immune system development kinetics in the prenatal period and early childhood. Innate and adaptive immune cells develop throughout the fetal period and early in life. Before and around birth, the fetal immune system is dominated by a pro-tolerogenic response and a Th2 cell polarization. Maternal IgG are transferred to the fetus before birth and confer a protective immunity to the neonate. The neonate B cells and innate immune cells are phenotypically similar to the adult before weaning. After weaning, the proportion of regulatory T cells (Tregs) increases and the infant presents a balanced lymphocyte Th1/Th2-polarization. Created by [BioRender.com](https://www.biorender.com), accessed on 20 April 2021.

Animal models—in particular the non-human primate (NHP) model—are useful for exploring novel hypotheses and for answering fundamental questions that are difficult or impossible to explore in humans. The NHP model has several advantages as a research model, such as its proximity to human genetics, physiology, and immune system as well as their susceptibility to many human infectious diseases having similar pathogenesis [4,5]. These similarities renders it a solid model for fundamental research studies including immune development in early life. The NHP model has contributed to a better understanding in reproductive and developmental science [6]. It is also a model of choice for the development of novel vaccines and therapies for the prevention and treatment of human diseases. We have summarized the main similarities and differences between humans and NHPs that are relevant in the mother–infant interphase in Figure 2.

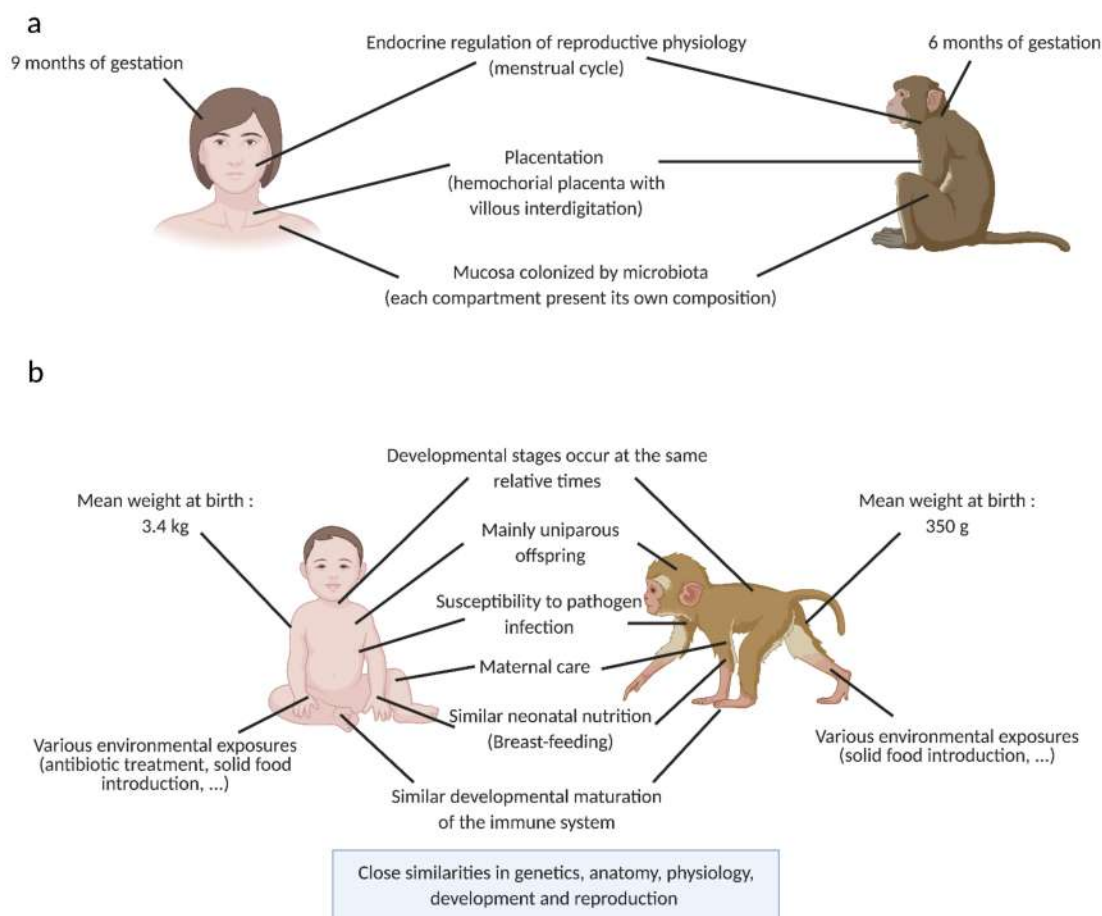


Figure 2. Comparison between the adult (a) or the infant (b) in human and in the non-human primate model: main characteristics relevant for the microbiota and the immune system study in neonates. Similar characteristics between models are shown in the middle of the figure. Specific characteristics for each model are shown in the lateral sides of the figure. Created by [BioRender.com](https://www.biorender.com), accessed on 20 April 2021.

We will focus on the ontogeny of immune maturation and its association to microbial colonization in newborns from conception to the food diversification. We underline the questions that are left to be answered and how the NHP model could help enlighten the path to answering these questions.

2. Pregnancy: Mother—Fetus Interactions

The vaginal microbiota in reproductive-aged women is classified in five community state types (CST) [7], where CST I, II, III and V are dominated by *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, and *L. jensenii*, respectively. CST IV does not have a dominant species

and is characterized by having a very low to absent lactobacilli and high anaerobic bacteria abundance. CST IV is often associated with bacterial vaginosis and inflammation. In the NHP model and, in particular, in macaques the vaginal microbiota is dominated by diverse anaerobes and has a low lactobacilli abundance [8].

During pregnancy, the vaginal microbiota of healthy women changes. It has been demonstrated by Romero et al. that lactobacilli (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, and *L. vaginalis*) abundances increase while anaerobes such as *Eggerthella*, *Dialister*, *Gardnerella*, and *Atopobium* abundances decrease as pregnancy progresses [9,10]. Pregnant women have less incidences of anaerobic bacteria that are associated with bacterial vaginosis and their vaginal microbiota possesses higher stability [9–11]. Interestingly, in Romero's studies, the relative abundance of *L. iners* was neither significantly different between pregnant and non-pregnant women nor for women who delivered at term vs. women who delivered preterm. On the contrary, Aagaard et al., states that there is indeed an enrichment in lactobacilli (*L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* and *L. johnsonii*) during pregnancy [11]. We can thus believe that lactobacilli plays a role in vaginal microbiota homeostasis during pregnancy. However, the presence and beneficial role of *L. iners* in vaginal health remains a matter of debate. *L. iners* is in fact widely associated with an inflammatory, dysbiotic, and prone to infection vaginal environment [12,13]. Its only presence in pregnant women microbiota suggests that there might not be natural protection in pregnant women to infection or inflammation.

Antibiotic use is quite extensive during pregnancy [14,15], with reported rates of 42% in France, 40% in the US, 33% in the United Kingdom, and 24% in Finland [14,16,17]. Among antibiotics, β -lactams are the most widely used and penicillin is the most frequently used. Antibiotic use during pregnancy or during partum impacts both the mother's microbiota on the birth canal and the vaginally delivered infant colonization [18,19]. For instance, the use of ampicillin for group B *Streptococcus* (GBS) treatment results in an increase in Proteobacteria and a decrease in Actinobacteria and Bacteroidetes in the gastrointestinal microbiota of vaginally born infants. These alterations decrease diversity in the gastrointestinal tract and persists up to twelve months after birth [18,20,21]. In addition, disruptions can increase the risk of neonate morbidity and negatively impact microbial colonization [19].

Maternal stress is another factor that impacts infant colonization. Gestational stress has a negative impact in fetus growth, weight, development, immunity, and cognitive function in infant rhesus primates (*Macaca mulatta*) [22,23]. In rhesus macaques, chronic stress also impairs prenatal transfer of antibodies to the fetus [24]. In addition, gestational stress alters colonization in the infant primate that possesses a reduced abundance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* compared to infant primates from undisturbed mothers [25]. The vertical transfer of *Bifidobacterium*, in particular *B. bifidum*, has also been observed in humans [26]. The reduction in lactobacilli and bifidobacteria have both been linked to diarrhea, food allergy, and chronic inflammatory bowel diseases [27,28]. Consistent with this observation, infant macaques born after disturbed gestations have a tendency for *Shigella flexneri* colonization.

Maternal environment and microbiota play a role in immune maturation. Numerous epidemiological studies show that prenatal maternal exposure to a rural environment is associated to a rapid maturation of Th17 lymphocytes in children and to a decreased risk of developing allergies or asthma [29]. The mother's vaginal microbiota plays an equal role in the fetus immune maturation where women with vaginal dysbiosis exhibit an increased concentration of interleukin 12 (IL-12) and a decreased concentration of CD45RO CD4+ T cells in the umbilical cord blood [30]. Indeed, endogenous lactobacilli present in the mother's vagina may impact CD4+ T cell maturation and lead to the generation of memory T cells. Nevertheless, the mechanisms by which the fetal immune system recognizes and responds to the mother's microbiota or to their metabolites are still unclear. The recognition process could be by leakage of bacterial antigens through the placenta. Exchanges of molecules across the placenta are well documented [31], particularly for selective transmission of maternal Immunoglobulin G (IgG) mediated by the neonatal

Fragment crystallizable receptor [32]. Antigens also reach the amniotic fluid with a very low efficacy through passive diffusion or paracellular transport across the fetal membranes [33], where fetal swallowing activity contributes to antigen exposure in the fetus' gastrointestinal tract mucosa.

During the late fetal period, when antigen presenting cells have reached mucosal tissues, antigens encountered can induce tolerance. This tolerance prevents an inflammatory response in the fetus to non-self-antigens, such as those from the mother or derived from food [34,35]. An important example of the importance of this exposure to non-self-antigens during pregnancy is provided by a study from Gomez de Aguero et al. showing that transient *E. coli* colonization of the gut of germ-free (GF) pregnant mice affects the offspring's immune system during gestation, with an increase in intestinal innate immune cells and pattern of gene expression in their gut compared to control mice [36]. Interestingly, the authors do not detect any live bacteria in the placenta or in the neonate, which suggests that the mechanism for this immune cell maturation likely involves bacterial metabolites, namely in that study, ligands for aryl hydrocarbon receptor. Other bacterial metabolites might be equally involved in gestational microbial shaping of immunity [37]. Unfortunately, bacterial metabolites are poorly studied in neonates and even less in the context of shaping the immune system during pregnancy.

Besides the role of the mother's intestinal and vaginal microbiota in neonate colonization, researchers questioned whether the upper female reproductive tract, the extraembryonic, and embryonic tissues were colonized by microbes. Potential microbial in utero colonization have to be clearly differentiated from the bacteria that are responsible for microbial invasion of the amniotic cavity (MIAC). Pathogens that are at the origin of MIAC are *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, and *Fusobacterium* spp. [38]. This microbial presence, however, is considered as an intrauterine infection that has severe outcomes that include preterm deliveries, fetal infection, and neonatal sepsis [39–41]. In the case of intrauterine infection, bacteria or inflammatory mediators can be swallowed by the fetus to trigger fetal immune response characterized by elevated IL-6 concentration in the umbilical cord [42]. Fetus exposed to inflammation also have monocyte, neutrophil, and lymphocyte activation in addition to a Th1-like response and a secretion of tumor necrosis factor α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), IL-1 β , and prostaglandins that can be traced to the origin of premature membrane rupture as well [43].

A commensal or symbiotic flora, by definition, does not have a negative outcome for mothers or for the children. Several studies published later show that bacterial DNA is present in the uterus, umbilical cord, placenta, meconium, and the fetus [44–48]. It is Proteobacteria that is the most prevalent phylum in amniotic fluid and placenta samples with *Enterobacter* and *Escherichia/Shigella* being the predominant genera [44,45]. *Escherichia/Shigella* and lactic acid bacteria (*Leuconostoc*, *Enterococcus Lactococcus*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus*) were also observed in meconium (the earliest stool sample of a newborn) but in lower abundance. Meconium microbiota cluster into two enterotypes. Those that are dominated by lactic acid or those dominated by enteric bacteria. These enterotypes are associated with respiratory problems in infants and further associated to a history of maternal eczema, respectively [46]. These results suggest that the neonate colonization has a uterine origin. However, most of these results rely mainly on DNA sequencing. Additionally, to avoid invasive procedures, samples are generally collected after delivery or C-section, which can put into question the sample's sterility. The observed results might be the amplification of contaminant DNA (laboratory or hospital environment linked to the sampling procedure) or the result of bacteria DNA presence in the uterus. DNA presence does not necessarily mean that there are metabolically active living bacteria. A recent study on rhesus macaques including not only sequencing but also bacterial culture and qPCR showed that cultures from fetal and placental tissues were very rare and inconsistent with an in utero colonization [49]. In fact, only *Cutibacterium acnes* was isolated from bacterial culture and the 16s rRNA gene sequence was detected in the

umbilical cord and fetal tissues. However, *C. acnes* DNA was also detected in the technical controls indicating that its presence might be due to contamination from the manipulator.

Currently, it is still controversial as to whether human colonization starts in utero and fetal microbial colonization remains an uncertain topic of discussion. What is equally important to highlight is that microbial antigens (including DNA) and food derived and maternally derived molecules can be found in the amniotic fluid [50–52]. Those antigens could be directly transferred into the amniotic fluid through passage across the fetal membranes [53]. All of these observations suggest that maternal prenatal factors can have a critical impact in the development of child health and disease.

The fetus has innate and adaptive immune cells that are present early during pregnancy. The development of the human immune system is in fact a continuous process that begins in utero. As pregnancy develops, the antigen presenting cells are formed: dendritic cells and monocytes are the first innate immune cells to appear around the fourth gestational week (GW). The thymus develops and matures between the GW10 and GW14, followed by the spleen and lymph nodes between GW14 and GW20. B and T cells largely naive in phenotype are detected around GW10. T and B zones in the spleen are formed in the middle of the second trimester (around GW20). Myeloid progenitors are abundant in fetal blood but their differentiation occurs during the late stage of pregnancy: mature neutrophils are the last cells to appear in fetal blood and their concentration increases just before birth, which is concomitant with increase in G-CSF levels [54].

During development, the fetus is exposed to several antigens that include both maternal and exogenous antigens. Prenatal exposition occurs via the placental barrier or via the amniotic fluid that is ingested by the fetus [34,35]. Importantly, transplacental transport of maternal Ig-antigen complexes can result in the priming of fetal immune cells [50]. The fetus is in fact able to generate an immune response. It has indeed been shown that it can respond to exogenous antigens, such as infectious agents or vaccines [55,56], but its response generates a low level of proinflammatory cytokines compared to neonates or adults where the number of interleukin 6 (IL-6) and TNF- α positive monocytes were significantly diminished. Fetal phagocytes display a significantly diminished phagocytic capacity and the expression of several adhesion molecules involved in adhesion, migration, and phagocytosis was simultaneously found to be decreased [57]. Conventional dendritic cells (cDCs) and plasmacytoid dendritic cells (pDC) are impaired in their IL-12 and IFN- α secretion, respectively, and fetal mononuclear cells also possess a reduced interleukin 2 (IL-2) production that is essential to T cell function [58]. T cell progenitors may express CD34 receptor and will migrate to the thymus to differentiate to mature CD4 or CD8 cells. T helper cells can be divided in several subsets including effector Th1 and Th2 CD4+ cells, which is defined by their cytokine profiles and regulatory T cells (Tregs). On one hand, Th1 cells are pro-inflammatory and secrete IFN- γ , IL-2 and TNF- α . On the other hand, Th2 cells produce cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13, and IL-10 that are mainly anti-inflammatory and pro-tolerogenic. Tregs are present in very high numbers in human cord blood and have an immunosuppressive function. The low level of proinflammatory cytokines produced by the fetus indicates that fetal immune responses are mainly immune-suppressing rather than immune-activating. In summary, fetal lymphocytes exhibit a preferential differentiation towards pro-tolerogenic cells and a Th2 response for T cells, allowing the formation of a repertoire of self-antigen tolerated by the fetal immune system. Maternal cells also contribute to the formation of the antigen-specific tolerance repertoire since they cross the placental barrier [35]. This tolerance is essential for avoiding potentially damaging immune reactions from the fetus towards maternal antigens and promotes the positive progress of pregnancy. In contrast, at birth, the neonatal immune system will have to switch from a predominantly tolerogenic response to an anti-microbial response suitable for protecting the newborn from the new microbe-rich environment after birth [3].

Altogether, these ideas support the fact that the maternal environment is crucial to the proper development of the fetus, the exact mechanisms of the triptych interaction between the mother, her microbiota, and the fetus for the development of fetal immune maturation

remain to be elucidated. In particular, the modalities of antigen exposure that determine immune system maturation remain an enigma. To give two examples, on one hand, fetal memory T cells are produced during uncomplicated pregnancies [54] and, on the other hand, neonates that have been exposed to maternal infection during pregnancy, but were not infected, developed an adaptative immune response to the pathogen [59]. In both cases we cannot explain the biological mechanisms for these phenomena.

Studies in NHP models would allow the investigation of many of these questions that are impossible to address in other models. For example, it would be possible to elucidate the possible role of various maternal factors (i.e., microbiome or infection) in the fetal immune system development. Indeed, in the NHP model, longitudinal follow-up of the maternal microbiome in various compartments and the observation of bacterial metabolite distribution during pregnancy or mucosal immunity in the developing fetus would be possible [60]. The NHP model would also offer an excellent preclinical model to test various strategies for treatments during pregnancy while simultaneously targeting an optimal fetal immune system development (Figure 3).

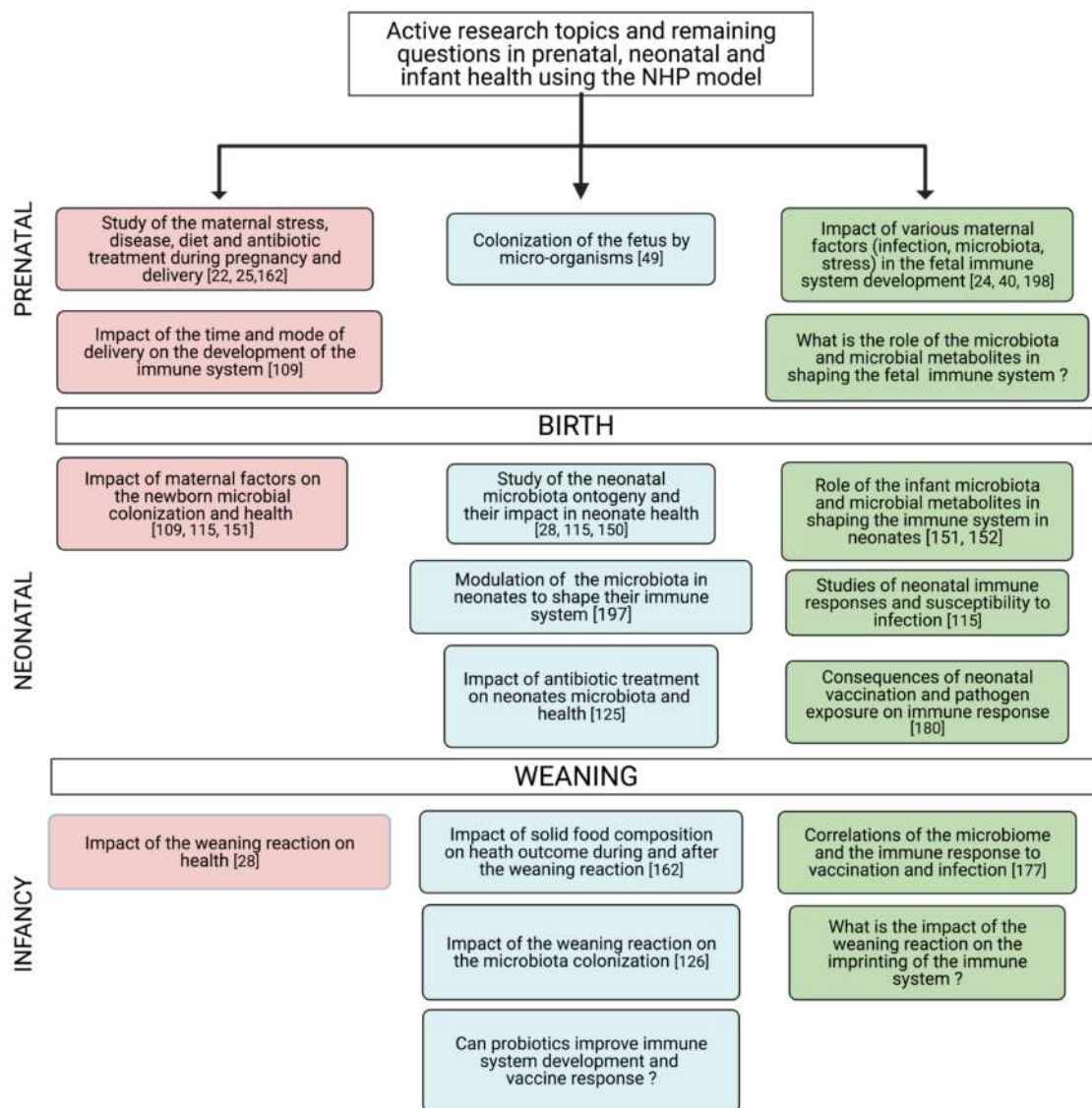


Figure 3. Summary of active research topics and questions to address the relationship between the microbiota and the immune system in the NHP model. Pink boxes represent the mother or parental-associated parameters, blue boxes represent microbiota studies, and green boxes represent immune system studies. The numbers represent the main references addressing the issue in the literature. Created by BioRender.com, accessed on 20 April 2021, [22,24,25,28,40,49,109,115,125,126,150–152,162,177,180,197,198].

3. Birth

During birth, for uncomplicated pregnancies, the newborn goes from a relatively aseptic environment to an environment that is highly diverse with an abundance of microorganisms. Faced with this brutal increase in microbial exposure, the newborn has to be able to control microbial colonization to avoid invasion by pathogens. Factors that influence microbial colonization and immune response to this colonization at birth include the mode of delivery and gestational age (GA) at term (Figure 1a).

3.1. Preterm vs. Term Delivery

In humans, preterm birth is defined as babies born alive before 37 weeks of pregnancy. Prematurity is the leading cause of death in children under the age of 5 years. The rate of preterm birth ranges from 5–18% and this rate is increasing worldwide (WHO, 2018). Preterm birth occurs for multiple reasons, from chronic disease in the mother (i.e., diabetes or preeclampsia) to multiple pregnancies or infections. However, most preterm births are idiopathic. The rupture of membranes is the opening of the membranes (amniotic sac) before labor. If this rupture occurs before 37 weeks, it is considered a premature rupture. A premature membrane rupture is often due to inflammation and pathogen colonization of the maternal and fetal tissues (chorioiddecidual space, chorion, amnion, placenta, amniotic fluid, umbilical cord, and the fetus itself). Bacteria invasion may have multiple origins such as hematogenous spread from the mother, needle contamination during amniocentesis, or ascension from the vagina. Preterm labor with intact membranes is associated to a vaginal dysbiosis [61,62].

Several clinical studies that followed women experiencing spontaneous and not infectious preterm birth and women who delivered at term showed that spontaneous preterm birth is associated to an increased vaginal bacterial diversity [61–64]. Most of the commonly identified vaginal bacteria in preterm birth are *Mollicutes*, *Meagaspheara*, *Prevotella*, *Sneathia*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Gardnerella*, *Streptococcus*, and *Bacteroides* [61,62,64,65]—all bacteria that are associated to a dysbiotic vaginal microbiota [7]. Interestingly, women that delivered at term are more likely to have an *L. crispatus* dominated microbiome [61,62,64].

At the time of birth, the neonate adaptive immune system is not fully mature and has to develop memory. Compared to adults, neonate immune cells harbors a different phenotype and different functions [66]. For example, neonate monocytes are poorly reactive to lipopolysaccharide (LPS) stimulation compared to adult monocytes [67]. The neonate's lymphocytes have a differentiation bias toward Th2 response [68] (Figure 1c), which makes the neonates more susceptible to various infections, especially in preterm children [69,70]. The full-term neonates are perfectly capable of triggering both innate and adaptative immune responses [71], however, they trigger a response that is qualitatively and quantitatively different from adults [72]. In the case of preterm babies, the phenotype and function of immune cells are altered compared to full-term children [43]. It has been observed that preterm children overexpress genes involved in the negative regulation of IFN- γ production and T cell proliferation, as well as the genes associated with IL-10 secretion [73]. These immune signatures in preterm babies can result in higher susceptibility to disease, deficient viral detection, and clearance [74]. Furthermore, preterm children possess decreased levels of maternal IgG compared to full-term children and this reduction is linked to the severity of their prematurity. Indeed, there is an exponential relationship between total IgG and GA in preterm infants [75]. More generally, GA appears to be an important parameter that influences immune cell differentiation in the neonate and not only in preterm infants [76]. Indeed, even if several studies mentioned before show great differences in immune cell populations or cytokine profiles between preterm and full-term children at birth, those differences are lost as the child grows [73].

3.2. Mode of Delivery: C-Section vs. Vaginal Delivery

Both the place and mode of delivery are critical in shaping the infant microbiotas [77]. Cesarean section (C-section) is a surgical intervention intended to reduce health risks of

mothers and their babies when vaginal birth is considered unsafe. However, in some countries, C-section is a choice and a number of women request to deliver by elective C-section without medical indications [78]. It is important to highlight that the effects of C-section on perinatal morbidity, pediatric outcomes, and disease are still unclear. Present research focuses mainly on the immediate effects of C-section relative to the infant and the mother's health.

There is evidence that the gastrointestinal tract of infants born either by C-section or vaginally are different not only in their composition but also on the timing of their colonization. During the first week of life, bacteria in the stool of vaginally delivered babies ranged from 10^9 to 10^{10} /g of feces, whereas C-section born babies had lower bacterial counts ($<10^8$ rRNA copies/g of feces) [79]. Vaginally delivered babies have an enrichment of *Lactobacillus* followed by a bloom of *Bacteroides* from week two after birth [80]. This was also observed in rhesus monkeys, where *Lactobacillus* was present during the first six months of life in naturally-born infant monkeys [25]. *Bifidobacterium* increases with a peak at eight weeks after birth but declined with the onset of weaning and the introduction of solid food [25]. Vaginally delivered newborns also harbor bacteria like *Enterococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, and *Rothia* [77]. Altogether, these results indicate that vaginally born neonates are inoculated by a mix of Gram positive and Gram negative bacteria that are both facultative aerobic and anaerobic bacteria.

C-sections are often associated to antibiotic use, low baby-mother contact, an underlying medical condition, pregnant pathologies, and a delay in breastfeeding [81,82]. All of these conditions, in addition to the C-section itself, result in a decreased bacterial diversity and richness in the gut characterized by a lower *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Bacteroidetes* abundance in infants [80,83–87]. C-section born babies also have an increase in *Clostridioides*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Veillonella* abundances [77,86,87], suggesting that skin and oral bacteria are the first colonizers in C-section born infants instead of bacteria from the mother's vaginal microbiota.

The differences in neonate microbial colonization and, in particular, the reduced diversity may be one of the explanations for the higher incidence of immune diseases and high inflammation in children born by C-section and in premature children [46,71,85,88]. In fact, decreased abundance of *Bacteroidetes* and *Bifidobacterium* is associated with the development of allergic or auto immune diseases. Interestingly, a reduced bacterial diversity is also found in breast milk from women who delivered through C-section compared to those who delivered vaginally [89,90].

The importance of the neonate colonization and the long-term health consequences between C-section and vaginally born infants remain unclear. Numerous epidemiological studies made an association between disturbances of the microbiota in childhood, associated with antibiotic treatments during pregnancy, and the development of a pathology in adulthood [91]. In fact, we know that intestinal disruptions are associated with immune diseases and chronic infections such as inflammatory bowel diseases [92–94], obesity [25,86,95], and asthma [96,97] in adults. However, it is difficult to tell whereas C-section is fully detrimental for children and its full impact on children's health remains unclear. A study in mice showed that the response of intestinal epithelial cells to LPS stimulation is stronger in vaginally born mice than in newborns by C-section [98]. In humans, studies on the relationship between C-section and the infant immune system have been inconsistent. Some studies suggest that there is no definite correlation between C-section born babies and the development of allergic rhinitis or atopic dermatitis [99–101], while others show that C-section is indeed associated with decreased pro-inflammatory cytokine response to Toll-like Receptor (TLR) 1 and 2 stimulation, a high bacterial colonization in the airways during late infancy, and a higher risk for infantile wheezing [102]. Furthermore, in children with increased genetic risk for type 1 diabetes, C-section is associated with transcriptional changes in blood cells and correlates with the initiation of islet autoimmunity, which precedes type 1 diabetes [103]. Other studies strongly indicate that there is also an association between C-section and childhood obesity [104]. In fact, C-section born babies

might have a microbiota prone to harvest more dietary nutrients, therefore predisposing them to being overweight. In addition, the absence of breastfeeding predisposes babies to excess adiposity and an increased Body Mass Index [105,106]. In another study, birth by C-section was associated with an increased risk for infection-related hospitalization [107]. Although such associations exist, the mechanisms for the relationships between the mode of delivery, the immune system maturation, and the disease apparition later in life remains largely unknown. This might be because postnatal factors are not always available in human studies. However, we do know from animal studies if the mode of delivery can impact host immunity directly [108]. The NHP model could be useful to address the impact of the mode of delivery on the development of the immune system in longitudinal studies taking into account the temporal dynamics of vaginal microbiota and other confounding factors [109].

In order to overcome potential health problems that result from a disturbed colonization at birth, physicians are now aiming to restore the microbiota of C-section delivered babies [80]. In a pilot clinical study, C-section delivered babies were inoculated with healthy vaginal microbiota (absence of GBS, no signs of vaginosis and vaginal pH below 4.5) from their mothers [80]. The microbiomes (anal, oral, and epithelial) of these treated infants resembled those of vaginally delivered infants during the first week after birth. As long as the mother's vaginal microbiome is characterized, these approaches might be a temporal solution to overcome the current unclear links between birth mode and future detrimental health outcomes in the child.

To summarize, colonization of mucosal surfaces at birth is mediated by different bacteria depending on the gestational age at birth and on the mode of delivery. The great diversity in those communities between individuals is directly translated by a great β -diversity at birth. Depending on the colonization, the different microbial populations induce various stimulations on immune cells. It is important to underline that the immune system is relatively naive at birth and does not respond strongly to antigen stimulations. This low reactivity provides a form of protection of the neonate against a strong immune reaction that could damage their good development [110–113]. Exposition to microorganisms at the beginning of life is important for permanently shaping the immune system [114] and for reducing the risk for developing immune-mediated pathologies later in life [91]. The NHP model allows the study of the acquisition of the microbiota and the associated maturation of the immune system in controlled settings, which enlightens the contribution of the numerous factors involved at the materno–neonatal interface [115].

4. Neonate Colonization and Role of the Breastfeeding

As shown in the previous chapters, the infant's gastrointestinal microbiota colonization at birth is directly linked to the mother's microbiota where the first colonizers of the baby are the bacteria from the mother. However, this first colonization is not stable in terms of time and many factors from the environment (nutrition, neonatal infection, antibiotic use, and local environment such as the presence of pets and pollution) impacts colonization and the early development of the immune system [116] (Figure 1a). Diet is known to be the main factor in shaping the gut microbiota in adults; it is also the main factor influencing the gut microbiota during the first six months of life [117]. As soon as lactation begins, novel microorganisms from the breast milk will be carried into the gut (Figure 1b). The importance of the intestinal microbiota (either the mother's or the neonate's) on the development of the immune system in newborns is perhaps best illustrated by GF or deliberately colonized gnotobiotic animals. It has been demonstrated that the microbiota improves digestion, stimulates the development of lymphoid structures, regulates innate and adaptive immune systems, provides colonization resistance against pathogens, and shapes the development of the nervous system and its behavior [118]. GF mice exhibit major developmental defects in primary and secondary lymphoid organs (Gut-associated Lymphoid Tissue (GALT), spleen, and thymus), in addition to abnormalities in the frequency, phenotype, and function of immune and intestinal cells [119–121].

To mention a few, GF intestines have reduced absorption of ingested materials with a reduced surface area of small intestines, altered enzyme expression and increased bilirubin in feces, reduced activation in intestinal macrophages and IgA secretion, low systemic Ig levels, and increased levels of pro-allergic signatures [119,122]. It has been shown in mice there is a vertical transfer of microbiota where IL10^{-/-} gnotobiotic pregnant mice harboring an antibiotic-disrupted microbiota transfers their gut microbiota to their pups [123]. The pups having inherited a disrupted microbiota which has a higher incidence of colonic inflammation compared to those that inherited a controlled microbiota [123,124]. In humans, a recent study demonstrated that prenatal antibiotic treatment or neonatal infections disrupt not only the microbiota but also the normal T cell population developmental trajectory. In infants whose microbial colonization was disrupted, the risk for respiratory morbidity is significantly increased [76]. The immune development and the absence or presence of disease is dependent on microbial colonization and on the perturbations of the maternal microbiota. It is thus essential to fully understand neonate colonization and immune development.

Although it is still impossible to generate GF NHP models, the primates can help us answer complex questions that cannot be assessed in other animal models or in human studies [6] (Figure 3). Such questions may include the impact of antibiotic use in neonate colonization and immune system maturation and their link to infectious or non-infectious diseases in early life and later life [125]. The NHP model allows the monitoring of the microbiota's early colonization in neonate, concomitantly with the bacterial metabolites produced and their respective role in shaping the immune system [126]. Indeed, as illustrated in Figure 4 below, the NHP model harbors several advantages for biomedical research.

What we know about the ontogeny of colonization is that the gut of a neonate is an aerobic environment that become anaerobic over time. The earliest colonizers include facultative aerobic bacteria such as *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and Enterobacteria [79,127] (Figure 1b). Oxygen consumption enables a shift to an anaerobic microbiota, including *Clostridiaceae*, Bacteroidetes, and *Bifidobacteria*. These bacteria are also found in aseptically collected breast milk [128]. The first 100 days of life seem to be a critical time-lapse for the establishment of relationships between the host and its microbiota [129]. Gut dysbiosis in neonates was associated with disease development [130,131]. Infants experiencing gut bacterial dysbiosis in the first two months of life had more circulating endothelial cells and activated T cell populations [73]. Newborn immune cell populations are very variable during the first three months of life where Olin et al. observed a transient expansion of monocytes, a gradual reduction in neutrophils, and an increase in CD4+ and CD8+ T cells upon birth followed by an increase in B cell abundance from one month of life [73]. In addition, neonate transcriptomic analysis revealed that between one and three months of life, the major upregulated genes are major histocompatibility complex (MHC) class II genes that are induced by IFN- γ upon microbial stimulation [73]. These results suggest that the first interactions with microorganisms are important for the development of the immune system very early in life. These interactions seem to allow the maturation of several innate immune cells (DCs and Natural-Killer NK cells) and naive B cells that acquire a phenotype close to the adult phenotype within the six months post birth (Figure 1C). In contrast, naive T cell phenotype varies a lot but does not converge to an adult phenotype during this period [73]. During the first six months of life, it is hard to clearly define a healthy baby microbiota. In fact, at an early age, babies' gastrointestinal microbiota composition is unstable and variable over time. A more stable colonization begins together with food intake and then evolves according to the different phases of the diet (lactation and weaning) [132]. However, the more the baby ages, the more its microbiota resembles that of an adult. Palmer et al. showed that, indeed, one year old babies have very similar microbiota compared to their adult parents intestinal microbiota [79].




	 Human	 Non-human primate	 Mouse
TISSUE ACCESSIBILITY	+/-	++	++
LONGITUDINAL STUDIES	+	++	++
MODIFICATION OF PRENATAL AND POSNATAL PARAMETERS	+/-	+	++
SUSCEPTIBILITY TO HUMAN PATHOGENS	++	++	+/-
PROXIMITY TO HUMAN IMMUNITY, PHYSIOLOGY, AND GENETICS	++	++	+/-
PROXIMITY TO HUMAN MICROBIOTA COMPOSITION	++	+	+/-
MANIPULATION OF THE MICROBIOTA	+	+	++
RELEVANCE FOR HUMAN CLINICAL SETTINGS	++	++	+/-
COST	++	++	+
GENETIC ENGINEERING	-	+/-	++
INTERINDIVIDUAL HETEROGENEITY	++	++	+/-
KNOWLEDGE ON THE MODEL	+	+	++

Figure 4. Comparison of the non-human primate and mouse models to the human. Created by [BioRender.com](https://www.biorender.com/), accessed on 20 April 2021.

Breast milk, by its composition, plays a crucial role in the development of the immune system [133]. It contains epithelial and immune cells, soluble factors such as immunoglobulins (IgAs, IgMs, and IgGs), antimicrobial factors, cytokines, growth hormones, digestive enzymes in addition to viable bacteria, and bacterial DNA [128,134–137]. Human milk also contains lactoferrin and, in addition to its function of iron binding and transport, has an important role in neonates where it has broad-spectrum antimicrobial activity and prevents invasive fungal infections [138]. The qualitative and quantitative composition of breast milk changes among women but also during the lactation period (between colostrum, transition, and mature milk for example) [89]. The composition and evolution of the milk is similar in various primate species and partly depends on the relative amount of fat and protein in the milk [139]. It is also different for women who give birth at term or preterm [140]. A comparison of several studies on bacteria composition indicates that *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Corynebacterium*, and *Enterococcus* are the most cited dominant genus in human milk [141].

In addition, there is evidence of a vertical transfer of bacteria between mother to infant via breastfeeding, where up to 88% of genera are shared between breast milk and infant fecal samples [90,142].

Breast-fed babies are exposed to multiple maternal components that shape their colonization and early immune response and maturation. It has been clearly shown in mice models that the transfer of maternal immune cells via the colostrum at the beginning of lactation not only gives the infant protective immunity through supplementation of Ig production but also modulates the infant's immune responses such as the modulation of the T cell mediated response and the development of the T cell repertoire [143]. As an example, IgA contained in breast milk contributes, together with neonatal Treg cells, to the suppression of T helper lymphocyte maturation at the level of the intestinal mucosa [144]. This process is maintained until weaning and allows the promotion of a pro-tolerogenic environment at the level of the infant intestinal mucosa [111] in favor of host/microbiota interactions. In addition, many cytokines such as IL-2, IL-6, IL-10, Tumor Growth Factor β (TGF- β), and Epidermal Growth Factor (EGF) present in breast milk have an immunomodulatory capacity and may influence the development of the neonatal immune system [133,140]. For example, IL-10 is a known anti-inflammatory cytokine that inhibits blood lymphocyte proliferation [145]. TGF- β regulates T cells, B cells, NK cells, macrophages, and DC functions [146]. However, few studies have presently investigated the influence of the cytokines in a relevant context of neonatal immune system maturation. Most of the studies were carried out on cord blood which appears to be a bad predictor for postnatal immune cell maturation [73]. The microbiota in the breast milk also provides a significant number of microbial antigens capable of stimulating the infant immune system. Breast milk also protects the intestinal mucosa of the newborn, which has low resistance to bacterial colonization, thus preventing the risk of colonization by pathogens. For example, it has been demonstrated that the expansion of *Enterobacteriaceae* is restricted by the IgA contained in breast milk, thus avoiding inappropriate immune stimulation that leads to a lower risk for Necrotizing Enterocolitis (NEC), which is a disease particularly common in non-breastfed premature children [147].

In comparison with formula fed babies, breastfed babies are colonized mainly by *Bifidobacterium* species (*B. breve* and *B. bifidum*) and *Lactobacillus* [148,149]. Breastfed babies exhibit a lower α -diversity at 40 days of age, with a low abundance of *Veillonella* and *Clostridioides*. However, when the bacteria diversity rises at six months of age, the breastfeeding associated differences are no longer observed [148]. In the NHP, studies showed no differences in the diversity of the gut microbiota between breastfed and formula fed infants before three months of age but the relative abundance of various bacteria genus such as *Clostridioides* and *Prevotella* was significantly different between the two groups [149]. This was associated with a different immune system development, with breast-fed infants developing more memory T cells and T helper 17 (Th17) cells than bottle-fed infants [150]. Differences between the groups persisted throughout the first year and could even be found in the fifth year of life [151]. These studies show that infant feeding practices can impact immunity years after birth.

5. Weaning and Food Diversification

Weaning is defined as the transition period of gradually introducing solid diet to an infant while withdrawing the supply of breast milk. It has been demonstrated that the microbial diversity in the infant's gut increases drastically during weaning [152–154] concomitant with an important immune reaction at the level of the intestinal mucosa. There is also an association of the cessation of breastfeeding; the introduction of food; the decrease in the abundance of *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, and *Enterobacteriaceae*; and the increase in abundance and in *Lachnospiraceae* (*Blautia*, *Roseburia*, *Pseudobutyrvibrio*, *Dorea*, *Coprococcus*, and *Lachnospiraceae incertae sedis*), *Ruminococcaceae* (*Faecalibacterium* and *Ruminococcus*), and *Clostridiaceae* [153,155].

In mice, the decrease in EGF in breast milk at the end of the lactation phase (between the tenth and twentieth day after birth in mice) leads to an opening of GAP junctions, an increased intestinal permeability, and promotes the exposure of microbial antigens to antigen presenting cells of the intestinal mucosa [110]. Bacterial antigens are taken up in the mucosa by dendritic cells of the lamina propria. Under non-inflammatory conditions, CD103 dendritic cells can induce T cell activation and promote the development of a tolerogenic response [145]. Food and microbial antigens (intestinal microbiota and microbial metabolites) are of great importance during this period as they are necessary for the proliferation of Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma (ROR- γ) Treg cells mediated by Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88). This reaction is called the weaning reaction. It induces tolerance to the various antigens encountered during this period and the immune system is “imprinted” by the microbiota and by food antigens [156]. This weaning reaction is limited in terms of time: in mice, the reaction involves Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) activation, which is induced only transiently by microbial antigens at weaning. CD4+ T cell reacts to the expanding commensal microorganisms and STAT3 phosphorylation is rapidly extinguished [157].

Interestingly after weaning the infant microbiota is not fully stable and significant changes in bacterial abundance occurs [155]. Several genus such as *Prevotella*, *Acinetobacter*, *Desulfovibrio*, *Veillonella*, and *Clostridioides* tended to appear and disappear during the infant’s first year of life [79] but as long as the breastfeeding continues, at least partially, there is a presence of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* [77,153]. The anaerobic bacteria present towards 12 months of age are efficient fiber and carbohydrate degraders, which indicates an adaptation towards an adult-like microbiota. It is not until three years old that changes in the bacterial abundance stabilize [155]. The variations in the composition of the microbiota during weaning also determine the modalities of exposure to microbial antigens and thus the outcome in terms of immune maturation. As an example, the intestinal microbiota in Russian infants is less rich in *Bacteroides* spp. compared to Finnish and Estonian infants. They exhibit a reduced risk for autoimmune diseases that is more common in Finnish and Estonian infants. In fact, in Finnish and Estonian infants, exposure to LPS arises primarily from *Bacteroides* which is a potent immune activator [158].

In addition, the timing of weaning is critical. In fact, a delayed exposure to diversified food (and thus a prolonged breastfeeding) has long-term health consequences with an increased susceptibility to immune pathology. A good example of the importance of the timing in the induction of tolerance by food diversification is shown in babies that were introduced to gluten-containing foods from four months of age (during lactation). These babies had, indeed, a reduced risk of coeliac disease later in life compared to when it was introduced after six months of age (after lactation stops) [159,160]. Late exposure to gluten does not allow gluten tolerance because the weaning reaction window is closed at six months [160]. Gluten therefore causes a chronic inflammation in a significant number of children that leads to coeliac disease later in life. This example shows that the weaning reaction consists in a second important window of opportunity for immune maturation. In fact, given that the infant microbiota is not stable until around three years old, during this period there might be a chance for microbial modulation and colonization. Studies in mice also emphasize the importance of this timing, since after the weaning reaction immune tolerance is less easy to induce [161]. The exact timing of this window is still under debate but in humans the window situates somewhere around the end of lactation (6 and 24 months old). Given that several immunological parameters such as tolerance are directly linked to this “window of colonization opportunity” period, it is of essential importance to clearly define the timing. This can be studied in the NHP model where the timing of food diversification and the cessation of lactation can be controlled [150,162]. In addition, the exact composition of the solid food components can be equally studied, which would allow scientists to directly associate a microbiota composition to a better health outcome in later life.

6. Microbiota and Response to Vaccination in Neonates

The maturation of immunity in children is also achieved through vaccination. The World Health Organization (WHO) states that more than 1 billion children were vaccinated over the last decade, preventing 2 to 3 million deaths every year [163]. Vaccine schedules may differ from country to country but vaccination in newborns remain a gold standard worldwide for vaccines such as diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) or Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccines (<https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/>, accessed on 20 April 2021). Nevertheless, even in countries with similar vaccine schedule, immunization varies greatly among vaccinated children [164]. For example, seroconversion rates to oral rotavirus (RV) vaccine is relatively low in low-income countries compared to high-income countries [165]. Similarly, response to hepatitis B, pneumococcal, or type B *Haemophilus influenzae* (Hib) vaccination can vary greatly between vaccinated infants [166]. It is thus important to understand the role of the different parameters involved in the modulation of vaccine efficacy [167]. The intestinal microbiota composition appears to be important to ensure good immunological responses to oral vaccines [168]. Several reviews surveyed the role of the microbiota in the modulation of vaccine efficacy [165,169]. There are few studies in humans and even less studies on infants [170–172]. In infants, these studies show a positive association between a high relative abundance of Actinobacteria (for oral and parenteral vaccines) or Firmicutes (for oral vaccines) and a high humoral and cellular vaccine response. On the contrary, Proteobacteria (oral and parenteral vaccines) and Bacteroidetes (oral vaccines) were associated with lower responses to vaccination. A more recent study showed that Actinobacteria is enriched in the gut microbiota of infants with good mucosal IgA responses to oral poliovirus vaccination. However, IgA-negative infants demonstrated a higher diversity and a higher abundance of Firmicutes (more particularly in the class of Clostridia) compared to IgA-positive infants [173].

The mechanisms of microbiota modulation of vaccine responses are poorly understood. Currently, the studies that examined this question are only addressed in adult subjects. An important study on this topic is the phase IIb clinical trial for a recombinant adenovirus-based HIV vaccine (HIV Vaccine Trials Network 505). The authors demonstrated that naive CD4 T and B cells were imprinted by intestinal microbiota-antigens, and that there was a cross-reactivity between intestinal microbiota antigens and vaccine antigens. This led to an intestinal microbiota/HIV-1 cross-reactive immune response that was not efficient in protecting a subject from HIV-1 infection [174]. The failure of this clinical trial raised awareness and underlined that the intestinal microbiota must be considered when choosing epitopes for adult vaccination since cross-reactivity can be an issue. This may also be the case for infant vaccines and further studies are needed to elucidate the interactions between the microbiota and the vaccine responses in infants.

The reverse effect of the vaccination on the microbiota has also to be taken into account. Vaccination could alter the microbiota composition but this effect seems to depend on the vaccine and on the microbiota. For oral rotavirus vaccination, the vaccine does not seem to have any impact on the human infant gut microbiota [175,176]. In a NHP model, two anti-influenza vaccine schedules had little impact on the gut microbiota of infant and juvenile rhesus macaques [177]. On the contrary, in the adult NHP, a mucosal SIV or HIV-1 vaccination protocol has been shown to alter the rectal microbiome. In vaccinated rhesus macaques, the rectal microbiome was strongly correlated to vaccine-induced immunity [178,179] and to viremia control [179]. These studies demonstrate the need to look at the microbiome in vaccine design and evaluation. More precise NGS studies and a resolution at a species or strain level would be useful to assess (and further manipulate) the infant's immune response to vaccination and the impact of vaccination on the microbiota.

Early life macaque immunization and longitudinal follow-up of the microbiota and the immune response to vaccination in different compartments would greatly improve the understanding of how the microbiota and its perturbations modulate vaccine efficacy [180].

7. Discussion

In this review we have highlighted the link between the mother microbiota, the neonate colonization, and its impact on its immune system development. We have synthesized the effects of the mother's vaginal and intestinal microbiota on the early neonate colonization potentially affecting its health and immune responses. Even if it is not clear whether if the intrauterine and fetal tissues are actively colonized by bacteria, we must highlight that there is indeed an exposition to maternal and exogenous antigens including bacteria-derived molecules. It is thus important to maintain healthy microbiotas when pregnant to minimize the potential detrimental effects due to dysbiosis, both on the mother and on the baby. On one hand, pregnant women, have dramatic hormonal shifts that alter their gut microbiota, intestinal function, and transit [181]. Alterations of the future mother microbiota has been associated to excessive gestational weight gain, obesity, metabolic disorders, increased risk of gestational diabetes, fetal macrosomia, or preeclampsia [182]. Children born to mothers with obesity or diabetes have reduced abundance of *Lactobacillus* in their gut, which is a biomarker of negative health outcomes [183]. On the other hand, the vaginal microbiota of the mother has a higher stability during pregnancy [9–11]. In addition, there is an association between inflammation—and potentially vaginal dysbiosis—and the induction of premature labor [61,62,184]. It is thus essential to consider the use of prebiotics or probiotics during pregnancy that may have a positive effect in the mother's health and, by consequence, on the babies' outcome.

Several clinical studies where pregnant women utilize known probiotic species that include *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, and *Bidifobacterium* species have shown a prevention or a reduction in the incidence of bacterial vaginosis and of spontaneous preterm delivery; and to improve the glucose metabolism, blood pressure, and the incidence of preeclampsia [185–187]. However, some studies have shown no effect [188,189]. The difficulty for assessing and comparing the impact of probiotic use is mainly due to the difference between studies in women ethnicity, administration route, duration and type of treatment, bacteria quantity, and the moment of use which are all parameters that will impact colonization. These differences may explain the absence of clear results on probiotic use. In addition, the use of lactobacilli strains that are not directly issued from the vaginal cavity and are not any of the species identified as the dominant lactobacilli of the vaginal microbiota (e.g., *L. crispatus*, *L. gasseri*, and *L. jensenii* in particular) is a major point to be considered. The ideal vaginal probiotic would be a locally used product, preferably a stable strain of *L. crispatus*—the species associated with the best vaginal health outcome [190]—in sufficient doses (10^8 minimum), to be administrated vaginally and to be used at least one full week off of the period when dysbiosis is present.

Considering the use of probiotics on pregnant women for beneficial effects on the fetus and newborn, clinical studies mainly point out beneficial effects on prenatal diseases as previously mentioned (preeclampsia, obesity, glucose metabolism, and preterm delivery) but not on the longitudinal outcomes of the baby. What we do know is that there is an exposition of the fetus to maternal and bacterial molecules [3]. During intrauterine gastrointestinal tract development, the fetus swallows increasing amounts of amniotic fluid that range from 200–250 mL/kg/day on the third trimester [191,192] and the ingestion contributes to the gastrointestinal tract development. Given that there is evidence of cell free DNA presence in the amniotic fluid, there is no evidence suggesting that this DNA originates from viable bacteria and thus it is difficult to believe that mother ingestion of probiotics would directly impact neonate gut maturation.

Considering the high intestinal permeability in the fetus [193], it would be interesting to assess the potential use of the amniotic fluid and uterine space as a therapeutic target. Further studies need to be conducted on the pharmacokinetics of potential antigens or bacterial metabolites crossing the materno–fetal membranes that could have a positive impact on the health of the fetus.

During the late stages of pregnancy and after birth, the mother's gut is more permeable. The hypothesis arose of an active migration or translocation of bacteria to the mammary glands vectored by immune cell migration from one site to another [194,195]. In addition, bacteria found in breast milk have shown immunomodulatory properties that could contribute to the proper development of the neonate immune system [196]. For example, in a NHP model, *Bifidobacterium animalis* supplementation during formula feeding has shown to impact the gut microbiota, the metabolome, and the immunity of infants [197]. If these findings are confirmed and considering that during the neonatal period the microbiota is particularly unstable, it might be appropriate to modify the mother microbiota to reach the newborn through lactation. In any case, it is necessary to study the mechanisms involved in the modulation of the fetal immune system by potential probiotic candidates.

Animal models will be required in order to have access to materno–fetal interfaces during pregnancy and to study mucosal immunity maturation in newborns. The NHP has been successfully used to study and manipulate this interface [198] and represents a relevant animal model that provides privileged access to a consequent amount of biological tissues.

When it comes to infants, the gut microbiota is more malleable during the first two years after birth. The use of probiotics can be used to correct alterations in the composition of the microbiota in newborns (for example, after antibiotic treatment) and to promote health outcomes [199]. Probiotic treatment could help enhance the immune response to many vaccines. However, up to the present point, probiotic bacteria seems to have a moderated effect on immune responses to vaccines since few clinical trials showed a significant effect of probiotic treatment on vaccine response [200,201], even if probiotics do have an impact on intestinal immune responses [168,202]. On the other hand, several studies have shown a positive impact of the use of probiotics on the neonate digestive system, immune system, and even in preventing necrotizing enterocolitis, which is an inflammation leading to high mortality and severe morbidity [203]. Probiotics can thus be exploited to improve the infants' health.

We have to keep in mind that with probiotics, effects are not only species-dependent but also strain-dependent. Thus, the rising knowledge on strain-dependent beneficial effects in health and the insights on different diets enlighten the path for targeted microbiota manipulation for long-term health benefits.

Author Contributions: N.N. and E.M. conceived the original idea for the review. N.N. wrote the first draft of the manuscript. L.R. completed the first draft, the subsequent edits, and the design of the figures. N.N. completed the figures and provided the last edits. E.M. provided critical feedback and edits throughout the work. The authors approved the final edit of the manuscript as submitted. All authors attest that they meet the ICMJE criteria for authorship. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Simon, A.K.; Hollander, G.A.; McMichael, A. Evolution of the Immune System in Humans from Infancy to Old Age. *Proc. Biol. Sci.* **2015**, *282*, 20143085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Belkaid, Y.; Harrison, O.J. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* **2017**, *46*, 562–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Apostol, A.C.; Jensen, K.D.C.; Beaudin, A.E. Training the Fetal Immune System Through Maternal Inflammation—A Layered Hygiene Hypothesis. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 123. [[CrossRef](#)]
4. Batchelder, C.A.; Duru, N.; Lee, C.I.; Baker, C.A.R.; Swainson, L.; Mccune, J.M.; Tarantal, A.F. Myeloid-Lymphoid Ontogeny in the Rhesus Monkey (*Macaca Mulatta*). *Anat. Rec.* **2014**, *297*, 1392–1406. [[CrossRef](#)]
5. Gardner, M.B.; Luciw, P.A. Macaque Models of Human Infectious Disease. *ILAR J.* **2008**, *49*, 220–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Burbacher, T.M.; Grant, K.S.; Worlein, J.; Ha, J.; Curnow, E.; Juul, S.; Sackett, G.P. Four Decades of Ground-Breaking Research in the Reproductive and Developmental Sciences: The Infant Primate Research Laboratory at the University of Washington National Primate Research Center. *Am. J. Primatol.* **2013**, *75*, 1063–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Ravel, J.; Gajer, P.; Abdo, Z.; Schneider, G.M.; Koenig, S.S.K.; McCulle, S.L.; Karlebach, S.; Gorle, R.; Russell, J.; Tacket, C.O.; et al. Vaginal Microbiome of Reproductive-Age Women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108* (Suppl. S1), 4680–4687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Nugeyre, M.-T.; Tchitchek, N.; Adapen, C.; Cannou, C.; Contreras, V.; Benjelloun, F.; Ravel, J.; Le Grand, R.; Marlin, R.; Menu, E. Dynamics of Vaginal and Rectal Microbiota Over Several Menstrual Cycles in Female Cynomolgus Macaques. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 188. [[CrossRef](#)]
9. Romero, R.; Hassan, S.S.; Gajer, P.; Tarca, A.L.; Fadrosch, D.W.; Nikita, L.; Galuppi, M.; Lamont, R.F.; Chaemsaitong, P.; Miranda, J.; et al. The Composition and Stability of the Vaginal Microbiota of Normal Pregnant Women Is Different from That of Non-Pregnant Women. *Microbiome* **2014**, *2*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Romero, R.; Hassan, S.S.; Gajer, P.; Tarca, A.L.; Fadrosch, D.W.; Bieda, J.; Chaemsaitong, P.; Miranda, J.; Chaiworapongsa, T.; Ravel, J. The Vaginal Microbiota of Pregnant Women Who Subsequently Have Spontaneous Preterm Labor and Delivery and Those with a Normal Delivery at Term. *Microbiome* **2014**, *2*, 18. [[CrossRef](#)]
11. Aagaard, K.; Riehle, K.; Ma, J.; Segata, N.; Mistretta, T.-A.; Coarfa, C.; Raza, S.; Rosenbaum, S.; den Veyver, I.V.; Milosavljevic, A.; et al. A Metagenomic Approach to Characterization of the Vaginal Microbiome Signature in Pregnancy. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36466. [[CrossRef](#)]
12. Tamarelle, J.; Ma, B.; Gajer, P.; Humphrys, M.S.; Terplan, M.; Mark, K.S.; Thiébaud, A.C.M.; Forney, L.J.; Brotman, R.M.; Delarocque-Astagneau, E.; et al. Nonoptimal Vaginal Microbiota After Azithromycin Treatment for Chlamydia Trachomatis Infection. *J. Infect. Dis.* **2020**, *221*, 627–635. [[CrossRef](#)]
13. Petrova, M.I.; Reid, G.; Vanechoutte, M.; Lebeer, S. Lactobacillus Iners: Friend or Foe? *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 182–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Andrade, S.E.; Gurwitz, J.H.; Davis, R.L.; Chan, K.A.; Finkelstein, J.A.; Fortman, K.; McPhillips, H.; Raebel, M.A.; Roblin, D.; Smith, D.H.; et al. Prescription Drug Use in Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2004**, *191*, 398–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Stokholm, J.; Schjørring, S.; Pedersen, L.; Bischoff, A.L.; Følsgaard, N.; Carson, C.G.; Chawes, B.L.K.; Bønnelykke, K.; Mølgaard, A.; Krogh, K.A.; et al. Prevalence and Predictors of Antibiotic Administration during Pregnancy and Birth. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lacroix, I.; Hurault, C.; Sarramon, M.F.; Guitard, C.; Berrebi, A.; Grau, M.; Albouy-Cossard, C.; Bourrel, R.; Elefant, E.; Montastruc, J.L.; et al. Prescription of Drugs during Pregnancy: A Study Using EFEMERIS, the New French Database. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *65*, 839–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Petersen, I.; Gilbert, R.; Evans, S.; Ridolfi, A.; Nazareth, I. Oral Antibiotic Prescribing during Pregnancy in Primary Care: UK Population-Based Study. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 2238–2246. [[CrossRef](#)]
18. Dierikx, T.H.; Visser, D.H.; Benninga, M.A.; van Kaam, A.H.L.C.; de Boer, N.K.H.; de Vries, R.; van Limbergen, J.; de Meij, T.G.J. The Influence of Prenatal and Intrapartum Antibiotics on Intestinal Microbiota Colonisation in Infants: A Systematic Review. *J. Infect.* **2020**, *81*, 190–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Stokholm, J.; Schjørring, S.; Eskildsen, C.E.; Pedersen, L.; Bischoff, A.L.; Følsgaard, N.; Carson, C.G.; Chawes, B.L.K.; Bønnelykke, K.; Mølgaard, A.; et al. Antibiotic Use during Pregnancy Alters the Commensal Vaginal Microbiota. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 629–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Mazzola, G.; Murphy, K.; Ross, R.P.; Gioia, D.D.; Biavati, B.; Corvaglia, L.T.; Faldella, G.; Stanton, C. Early Gut Microbiota Perturbations Following Intrapartum Antibiotic Prophylaxis to Prevent Group B Streptococcal Disease. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157527. [[CrossRef](#)]
21. Seedat, F.; Stinton, C.; Patterson, J.; Geppert, J.; Tan, B.; Robinson, E.R.; McCarthy, N.D.; Uthman, O.A.; Freeman, K.; Johnson, S.A.; et al. Adverse Events in Women and Children Who Have Received Intrapartum Antibiotic Prophylaxis Treatment: A Systematic Review. *BMC Pregnancy Childbirth* **2017**, *17*, 247. [[CrossRef](#)]
22. Schneider, M.L. The Effect of Mild Stress during Pregnancy on Birthweight and Neuromotor Maturation in Rhesus Monkey Infants (Macaca Mulatta). *Infant Behav. Dev.* **1992**, *15*, 389–403. [[CrossRef](#)]
23. Coe, C.L.; Lubach, G.R.; Busbridge, M.; Chapman, R.S. Optimal Iron Fortification of Maternal Diet during Pregnancy and Nursing for Investigating and Preventing Iron Deficiency in Young Rhesus Monkeys. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *94*, 549–554. [[CrossRef](#)]
24. Stammen, R.L.; Cohen, J.K.; Meeker, T.L.; Crane, M.M.; Amara, R.R.; Hicks, S.L.; Meyer, J.S.; Ethun, K.F. Effect of Chronic Social Stress on Prenatal Transfer of Antitetanus Immunity in Captive Breeding Rhesus Macaques (Macaca Mulatta). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **2018**, *57*, 357–367. [[CrossRef](#)]
25. Bailey, M.T.; Lubach, G.R.; Coe, C.L. Prenatal Stress Alters Bacterial Colonization of the Gut in Infant Monkeys. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2004**, *38*, 414–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Grönlund, M.-M.; Grześkowiak, Ł.; Isolauri, E.; Salminen, S. Influence of Mother’s Intestinal Microbiota on Gut Colonization in the Infant. *Gut Microbes* **2011**, *2*, 227–233. [[CrossRef](#)]
27. Kirjavainen, P.V.; Arvola, T.; Salminen, S.J.; Isolauri, E. Aberrant Composition of Gut Microbiota of Allergic Infants: A Target of Bifidobacterial Therapy at Weaning? *Gut* **2002**, *51*, 51–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rhoades, N.; Barr, T.; Hendrickson, S.; Prongay, K.; Haertel, A.; Gill, L.; Garzel, L.; Whiteson, K.; Slifka, M.; Messaoudi, I. Maturation of the Infant Rhesus Macaque Gut Microbiome and Its Role in the Development of Diarrheal Disease. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Lluís, A.; Depner, M.; Gaugler, B.; Saas, P.; Casaca, V.I.; Raedler, D.; Michel, S.; Tost, J.; Liu, J.; Genuneit, J.; et al. Increased Regulatory T-Cell Numbers Are Associated with Farm Milk Exposure and Lower Atopic Sensitization and Asthma in Childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *133*, 551–559.e10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Stencel-Gabriel, K.; Gabriel, I.; Wiczkowski, A.; Paul, M.; Olejek, A. ORIGINAL ARTICLE: Prenatal Priming of Cord Blood T Lymphocytes by Microbiota in the Maternal Vagina. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2009**, *61*, 246–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Sibley, C.P.; Brownbill, P.; Glazier, J.D.; Greenwood, S.L. Knowledge Needed about the Exchange Physiology of the Placenta. *Placenta* **2018**, *64*, S9–S15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Simister, N.E. Placental Transport of Immunoglobulin G. *Vaccine* **2003**, *21*, 3365–3369. [[CrossRef](#)]
33. Menjoge, A.R.; Navath, R.S.; Asad, A.; Kannan, S.; Kim, C.J.; Romero, R.; Kannan, R.M. Transport and Biodistribution of Dendrimers Across Human Fetal Membranes: Implications for Intravaginal Administration of Dendrimers. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5007–5021. [[CrossRef](#)]
34. Billingham, R.E.; Brent, L.; Medawar, P.B. Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. *Nature* **1953**, *172*, 603–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mold, J.E.; Michaëlsson, J.; Burt, T.D.; Muench, M.O.; Beckerman, K.P.; Busch, M.P.; Lee, T.-H.; Nixon, D.F.; McCune, J.M. Maternal Alloantigens Promote the Development of Tolerogenic Fetal Regulatory T Cells in Utero. *Science* **2008**, *322*, 1562–1565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. De Agüero, M.G.; Ganal-Vonarburg, S.C.; Fuhrer, T.; Rupp, S.; Uchimura, Y.; Li, H.; Steinert, A.; Heikenwalder, M.; Hapfelmeier, S.; Sauer, U.; et al. The Maternal Microbiota Drives Early Postnatal Innate Immune Development. *Science* **2016**, *351*, 1296–1302. [[CrossRef](#)]
37. Postler, T.S.; Ghosh, S. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 110–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Romero, R.; Sirtori, M.; Oyarzun, E.; Avila, C.; Mazor, M.; Callahan, R.; Sabo, V.; Athanassiadis, A.P.; Hobbins, J.C. Infection and Labor. V. Prevalence, Microbiology, and Clinical Significance of Intraamniotic Infection in Women with Preterm Labor and Intact Membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1989**, *161*, 817–824. [[CrossRef](#)]
39. Jacobsson, B.; Mattsby-Baltzer, I.; Andersch, B.; Bokström, H.; Holst, R.-M.; Nikolaitchouk, N.; Wennerholm, U.-B.; Hagberg, H. Microbial Invasion and Cytokine Response in Amniotic Fluid in a Swedish Population of Women with Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2003**, *82*, 423–431. [[CrossRef](#)]
40. Novy, M.J.; Duffy, L.; Axthelm, M.K.; Sadowsky, D.W.; Witkin, S.S.; Gravett, M.G.; Cassell, G.H.; Waites, K.B. Ureaplasma Parvum or Mycoplasma Hominis as Sole Pathogens Cause Chorioamnionitis, Preterm Delivery, and Fetal Pneumonia in Rhesus Macaques. *Reprod. Sci.* **2009**, *16*, 56–70. [[CrossRef](#)]
41. Romero, R.; Gómez, R.; Chaiworapongsa, T.; Conoscenti, G.; Kim, J.C.; Kim, Y.M. The Role of Infection in Preterm Labour and Delivery. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **2001**, *15* (Suppl. S2), 41–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wolfsberger, C.H.; Bruckner, M.; Baik-Schneditz, N.; Schwabegger, B.; Mileder, L.P.; Avian, A.; Urlesberger, B.; Pichler, G. Fetal Inflammatory Response Syndrome and Cerebral Oxygenation During Immediate Postnatal Transition in Preterm Neonates. *Front. Pediatr.* **2020**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Melville, J.M.; Moss, T.J.M. The Immune Consequences of Preterm Birth. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*. [[CrossRef](#)]
44. Aagaard, K.; Ma, J.; Antony, K.M.; Ganu, R.; Petrosino, J.; Versalovic, J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 237ra65. [[CrossRef](#)]
45. Collado, M.C.; Rautava, S.; Aakko, J.; Isolauri, E.; Salminen, S. Human Gut Colonisation May Be Initiated in Utero by Distinct Microbial Communities in the Placenta and Amniotic Fluid. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gosalbes, M.J.; Llop, S.; Vallès, Y.; Moya, A.; Ballester, E.; Francino, M.P. Meconium Microbiota Types Dominated by Lactic Acid or Enteric Bacteria Are Differentially Associated with Maternal Eczema and Respiratory Problems in Infants. *Clin. Exp. Allergy* **2013**, *43*, 198–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Jiménez, E.; Fernández, L.; Marín, M.L.; Martín, R.; Odriozola, J.M.; Nuño-Palop, C.; Narbad, A.; Olivares, M.; Xaus, J.; Rodríguez, J.M. Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. *Curr. Microbiol.* **2005**, *51*, 270–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Stout, M.J.; Conlon, B.; Landeau, M.; Lee, I.; Bower, C.; Zhao, Q.; Roehl, K.A.; Nelson, D.M.; Macones, G.A.; Mysorekar, I.U. Identification of Intracellular Bacteria in the Basal Plate of the Human Placenta in Term and Preterm Gestations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2013**, *208*, 226.e1–226.e7. [[CrossRef](#)]
49. Theis, K.R.; Romero, R.; Winters, A.D.; Jobe, A.H.; Gomez-Lopez, N. Lack of Evidence for Microbiota in the Placental and Fetal Tissues of Rhesus Macaques. *mSphere* **2020**, *5*. [[CrossRef](#)]
50. Malek, A.; Sager, R.; Lang, A.B.; Schneider, H. Protein Transport Across the In Vitro Perfused Human Placenta. *Am. J. Reprod. Immunol.* **1997**, *38*, 263–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Quan, C.P.; Forestier, F.; Bouvet, J.P. Immunoglobulins of the Human Amniotic Fluid. *Am. J. Reprod. Immunol.* **1999**, *42*, 219–225. [[CrossRef](#)]
52. Urushiyama, D.; Suda, W.; Ohnishi, E.; Araki, R.; Kiyoshima, C.; Kurakazu, M.; Sanui, A.; Yotsumoto, F.; Murata, M.; Nabeshima, K.; et al. Microbiome Profile of the Amniotic Fluid as a Predictive Biomarker of Perinatal Outcome. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Sherer, D.M. A Review of Amniotic Fluid Dynamics and the Enigma of Isolated Oligohydramnios. *Am. J. Perinatol.* **2002**, *19*, 253–266. [[CrossRef](#)]
54. Zhang, X.; Zhivaki, D.; Lo-Man, R. Unique Aspects of the Perinatal Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 495–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Marchant, A.; Appay, V.; Van Der Sande, M.; Dulphy, N.; Liesnard, C.; Kidd, M.; Kaye, S.; Ojuola, O.; Gillespie, G.M.A.; Vargas Cuero, A.L.; et al. Mature CD8(+) T Lymphocyte Response to Viral Infection during Fetal Life. *J. Clin. Investig.* **2003**, *111*, 1747–1755. [[CrossRef](#)]
56. Rastogi, D.; Wang, C.; Mao, X.; Lendor, C.; Rothman, P.B.; Miller, R.L. Antigen-Specific Immune Responses to Influenza Vaccine in Utero. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1637–1646. [[CrossRef](#)]
57. Strunk, T.; Temming, P.; Gembruch, U.; Reiss, I.; Bucsky, P.; Schultz, C. Differential Maturation of the Innate Immune Response in Human Fetuses. *Pediatr. Res.* **2004**, *56*, 219–226. [[CrossRef](#)]
58. Contractor, N.; Louten, J.; Kim, L.; Biron, C.A.; Kelsall, B.L. Cutting Edge: Peyer’s Patch Plasmacytoid Dendritic Cells (PDCs) Produce Low Levels of Type I Interferons: Possible Role for IL-10, TGF β , and Prostaglandin E2 in Conditioning a Unique Mucosal PDC Phenotype. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 2690–2694. [[CrossRef](#)]
59. Dauby, N.; Goetghebuer, T.; Kollmann, T.R.; Levy, J.; Marchant, A. Uninfected but Not Unaffected: Chronic Maternal Infections during Pregnancy, Fetal Immunity, and Susceptibility to Postnatal Infections. *Lancet Infect. Dis.* **2012**, *12*, 330–340. [[CrossRef](#)]
60. Lee, C.I.; Goldstein, O.; Han, V.K.M.; Tarantal, A.F. IGF-II and IGF Binding Protein (IGFBP-1, IGFBP-3) Gene Expression in Fetal Rhesus Monkey Tissues during the Second and Third Trimesters. *Pediatr. Res.* **2001**, *49*, 379–387. [[CrossRef](#)]
61. Brown, R.G.; Marchesi, J.R.; Lee, Y.S.; Smith, A.; Lehne, B.; Kindinger, L.M.; Terzidou, V.; Holmes, E.; Nicholson, J.K.; Bennett, P.R.; et al. Vaginal Dysbiosis Increases Risk of Preterm Fetal Membrane Rupture, Neonatal Sepsis and Is Exacerbated by Erythromycin. *BMC Med.* **2018**, *16*, 9. [[CrossRef](#)]
62. Fettweis, J.M.; Serrano, M.G.; Brooks, J.P.; Edwards, D.J.; Girerd, P.H.; Parikh, H.I.; Huang, B.; Arodz, T.J.; Edupuganti, L.; Glascock, A.L.; et al. The Vaginal Microbiome and Preterm Birth. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1012–1021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Baldwin, E.A.; Walther-Antonio, M.; MacLean, A.M.; Gohl, D.M.; Beckman, K.B.; Chen, J.; White, B.; Creedon, D.J.; Chia, N. Persistent Microbial Dysbiosis in Preterm Premature Rupture of Membranes from Onset until Delivery. *PeerJ* **2015**, *3*, e1398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Freitas, A.R.; Novais, C.; Ruiz-Garbajosa, P.; Coque, T.M.; Peixe, L. Dispersion of Multidrug-Resistant Enterococcus Faecium Isolates Belonging to Major Clonal Complexes in Different Portuguese Settings. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 4904–4908. [[CrossRef](#)]
65. Krohn, M.A.; Hillier, S.L.; Nugent, R.P.; Cotch, M.F.; Carey, J.C.; Gibbs, R.S.; Eschenbach, D.A. The Genital Flora of Women with Intraamniotic Infection. Vaginal Infection and Prematurity Study Group. *J. Infect. Dis.* **1995**, *171*, 1475–1480. [[CrossRef](#)]
66. Mold, J.E.; Réu, P.; Olin, A.; Bernard, S.; Michaëlsson, J.; Rane, S.; Yates, A.; Khosravi, A.; Salehpour, M.; Possnert, G.; et al. Cell Generation Dynamics Underlying Naive T-Cell Homeostasis in Adult Humans. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, e3000383. [[CrossRef](#)]
67. Ulas, T.; Pirr, S.; Fehlhaber, B.; Bickes, M.S.; Loof, T.G.; Vogl, T.; Mellinger, L.; Heinemann, A.S.; Burgmann, J.; Schöning, J.; et al. S100-A12-Induced Innate Immune Programming Protects Newborn Infants from Sepsis. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 622–632. [[CrossRef](#)]
68. Gibbons, D.; Fleming, P.; Virasami, A.; Michel, M.-L.; Sebire, N.J.; Costeloe, K.; Carr, R.; Klein, N.; Hayday, A. Interleukin-8 (CXCL8) Production Is a Signatory T Cell Effector Function of Human Newborn Infants. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1206–1210. [[CrossRef](#)]
69. Basha, S.; Surendran, N.; Pichichero, M. Immune Responses in Neonates. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2014**, *10*, 1171–1184. [[CrossRef](#)]
70. Kollmann, T.R.; Marchant, A. Immunity and Immunopathology in Early Human Life. *Semin. Immunopathol.* **2017**, *39*, 575–576. [[CrossRef](#)]
71. Hornef, M.W.; Torow, N. ‘Layered Immunity’ and the ‘Neonatal Window of Opportunity’—Timed Succession of Non-redundant Phases to Establish Mucosal Host–Microbial Homeostasis after Birth. *Immunology* **2020**, *159*, 15–25. [[CrossRef](#)]
72. Pott, J.; Stockinger, S.; Torow, N.; Smoczek, A.; Lindner, C.; McInerney, G.; Bäckhed, F.; Baumann, U.; Pabst, O.; Bleich, A.; et al. Age-Dependent TLR3 Expression of the Intestinal Epithelium Contributes to Rotavirus Susceptibility. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002670. [[CrossRef](#)]
73. Olin, A.; Henckel, E.; Chen, Y.; Lakshminanth, T.; Pou, C.; Mikes, J.; Gustafsson, A.; Bernhardsson, A.K.; Zhang, C.; Bohlin, K.; et al. Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell* **2018**, *174*, 1277–1292.e14. [[CrossRef](#)]
74. Pichler, K.; Assadian, O.; Berger, A. Viral Respiratory Infections in the Neonatal Intensive Care Unit—A Review. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
75. Hobbs, J.R.; Davis, J.A. Serum γ G-globulin levels and gestational age in premature babies. *Lancet* **1967**, *289*, 757–759. [[CrossRef](#)]
76. Grier, A.; Laniewski, N.; Gill, A.L.; Kessler, H.A.; Huyck, H.; Carbonell, E.; Holden-Wiltse, J.; Bandyopadhyay, S.; Carnahan, J.; Dylag, A.M.; et al. Aberrant Newborn T Cell and Microbiota Developmental Trajectories Predict Respiratory Compromise during Infancy. *bioRxiv* **2020**, 736090. [[CrossRef](#)]
77. Bäckhed, F.; Roswall, J.; Peng, Y.; Feng, Q.; Jia, H.; Kovatcheva-Datchary, P.; Li, Y.; Xia, Y.; Xie, H.; Zhong, H.; et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 690–703. [[CrossRef](#)]
78. Christilaw, J.E. Cesarean Section by Choice: Constructing a Reproductive Rights Framework for the Debate. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2006**, *94*, 262–268. [[CrossRef](#)]

79. Palmer, C.; Bik, E.M.; DiGiulio, D.B.; Relman, D.A.; Brown, P.O. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e177. [[CrossRef](#)]
80. Dominguez-Bello, M.G.; De Jesus-Laboy, K.M.; Shen, N.; Cox, L.M.; Amir, A.; Gonzalez, A.; Bokulich, N.A.; Song, S.J.; Hoashi, M.; Rivera-Vinas, J.I.; et al. Partial Restoration of the Microbiota of Cesarean-Born Infants via Vaginal Microbial Transfer. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 250–253. [[CrossRef](#)]
81. Hobbs, A.J.; Mannion, C.A.; McDonald, S.W.; Brockway, M.; Tough, S.C. The Impact of Caesarean Section on Breastfeeding Initiation, Duration and Difficulties in the First Four Months Postpartum. *BMC Pregnancy Childbirth* **2016**, *16*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Prior, E.; Santhakumaran, S.; Gale, C.; Philipps, L.H.; Modi, N.; Hyde, M.J. Breastfeeding after Cesarean Delivery: A Systematic Review and Meta-Analysis of World Literature. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 1113–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Adlerberth, I.; Lindberg, E.; Aberg, N.; Hesselmar, B.; Saalman, R.; Strannegård, I.-L.; Wold, A.E. Reduced Enterobacterial and Increased Staphylococcal Colonization of the Infantile Bowel: An Effect of Hygienic Lifestyle? *Pediatr. Res.* **2006**, *59*, 96–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Azad, M.B.; Konya, T.; Maughan, H.; Guttman, D.S.; Field, C.J.; Chari, R.S.; Sears, M.R.; Becker, A.B.; Scott, J.A.; Kozylskyj, A.L. Gut Microbiota of Healthy Canadian Infants: Profiles by Mode of Delivery and Infant Diet at 4 Months. *CMAJ* **2013**, *185*, 385–394. [[CrossRef](#)]
85. Jakobsson, H.E.; Abrahamsson, T.R.; Jenmalm, M.C.; Harris, K.; Quince, C.; Jernberg, C.; Björkstén, B.; Engstrand, L.; Andersson, A.F. Decreased Gut Microbiota Diversity, Delayed Bacteroidetes Colonisation and Reduced Th1 Responses in Infants Delivered by Caesarean Section. *Gut* **2014**, *63*, 559–566. [[CrossRef](#)]
86. Rutayisire, E.; Huang, K.; Liu, Y.; Tao, F. The Mode of Delivery Affects the Diversity and Colonization Pattern of the Gut Microbiota during the First Year of Infants' Life: A Systematic Review. *BMC Gastroenterol.* **2016**, *16*, 86. [[CrossRef](#)]
87. Selma-Royo, M.; Calatayud Arroyo, M.; García-Mantrana, I.; Parra-Llorca, A.; Escuriet, R.; Martínez-Costa, C.; Collado, M.C. Perinatal Environment Shapes Microbiota Colonization and Infant Growth: Impact on Host Response and Intestinal Function. *Microbiome* **2020**, *8*, 167. [[CrossRef](#)]
88. Abrahamsson, T.R.; Jakobsson, H.E.; Andersson, A.F.; Björkstén, B.; Engstrand, L.; Jenmalm, M.C. Low Diversity of the Gut Microbiota in Infants with Atopic Eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *129*, 434–440.e2. [[CrossRef](#)]
89. Cabrera-Rubio, R.; Collado, M.C.; Laitinen, K.; Salminen, S.; Isolauri, E.; Mira, A. The Human Milk Microbiome Changes over Lactation and Is Shaped by Maternal Weight and Mode of Delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 544–551. [[CrossRef](#)]
90. Murphy, K.; Curley, D.; O'Callaghan, T.F.; O'Shea, C.-A.; Dempsey, E.M.; O'Toole, P.W.; Ross, R.P.; Ryan, C.A.; Stanton, C. The Composition of Human Milk and Infant Faecal Microbiota Over the First Three Months of Life: A Pilot Study. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)]
91. Gensollen, T.; Iyer, S.S.; Kasper, D.L.; Blumberg, R.S. How Colonization by Microbiota in Early Life Shapes the Immune System. *Science* **2016**, *352*, 539–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. O'Neill, I.; Schofield, Z.; Hall, L. Exploring the Role of the Microbiota Member Bifidobacterium in Modulating Immune-Linked Diseases. *Emerg. Top. Life Sci.* **2017**, *1*, 333–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Sevelsted, A.; Stokholm, J.; Bønnelykke, K.; Bisgaard, H. Cesarean Section and Chronic Immune Disorders. *Pediatrics* **2015**, *135*, e92–e98. [[CrossRef](#)]
94. Wang, W.; Chen, L.; Zhou, R.; Wang, X.; Song, L.; Huang, S.; Wang, G.; Xia, B. Increased Proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus Group and Loss of Butyrate-Producing Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 398–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Yuan, Y.-Q.; Li, F.; Meng, P.; You, J.; Wu, M.; Li, S.-G.; Chen, B. Gender Difference on the Association between Dietary Patterns and Obesity in Chinese Middle-Aged and Elderly Populations. *Nutrients* **2016**, *8*, 448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Goksör, E.; Alm, B.; Pettersson, R.; Möllborg, P.; Erdes, L.; Aberg, N.; Wennergren, G. Early Fish Introduction and Neonatal Antibiotics Affect the Risk of Asthma into School Age. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2013**, *24*, 339–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Russell, S.L.; Gold, M.J.; Willing, B.P.; Thorson, L.; McNagny, K.M.; Finlay, B.B. Perinatal Antibiotic Treatment Affects Murine Microbiota, Immune Responses and Allergic Asthma. *Gut Microbes* **2013**, *4*, 158–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Lotz, M.; Gütle, D.; Walther, S.; Ménard, S.; Bogdan, C.; Hornef, M.W. Postnatal Acquisition of Endotoxin Tolerance in Intestinal Epithelial Cells. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 973–984. [[CrossRef](#)]
99. Liao, Z.; Lamb, K.E.; Burgner, D.; Ranganathan, S.; Miller, J.E.; Koplun, J.J.; Dharmage, S.C.; Lowe, A.J.; Ponsonby, A.-L.; Tang, M.L.K.; et al. No Obvious Impact of Caesarean Delivery on Childhood Allergic Outcomes: Findings from Australian Cohorts. *Arch. Dis. Child.* **2020**, *105*, 664–670. [[CrossRef](#)]
100. Richards, M.; Ferber, J.; Chen, H.; Swor, E.; Quesenberry, C.P.; Li, D.-K.; Darrow, L.A. Caesarean Delivery and the Risk of Atopic Dermatitis in Children. *Clin. Exp. Allergy* **2020**, *50*, 805–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Richards, M.; Ferber, J.; Li, D.-K.; Darrow, L.A. Cesarean Delivery and the Risk of Allergic Rhinitis in Children. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2020**, *125*, 280–286.e5. [[CrossRef](#)]
102. Liao, S.-L.; Tsai, M.-H.; Yao, T.-C.; Hua, M.-C.; Yeh, K.-W.; Chiu, C.-Y.; Su, K.-W.; Huang, S.-Y.; Kao, C.-C.; Lai, S.-H.; et al. Caesarean Section Is Associated with Reduced Perinatal Cytokine Response, Increased Risk of Bacterial Colonization in the Airway, and Infantile Wheezing. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

103. Laimighofer, M.; Lickert, R.; Fuerst, R.; Theis, F.J.; Winkler, C.; Bonifacio, E.; Ziegler, A.-G.; Krumsiek, J. Common Patterns of Gene Regulation Associated with Cesarean Section and the Development of Islet Autoimmunity—Indications of Immune Cell Activation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Kuhle, S.; Tong, O.S.; Woolcott, C.G. Association between Caesarean Section and Childhood Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes. Rev.* **2015**, *16*, 295–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Gopinath, B.; Subramanian, I.; Flood, V.M.; Baur, L.A.; Pfund, N.; Burlutsky, G.; Mitchell, P. Relationship between Breast-Feeding and Adiposity in Infants and Pre-School Children. *Public Health Nutr.* **2012**, *15*, 1639–1644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Yan, J.; Liu, L.; Zhu, Y.; Huang, G.; Wang, P.P. The Association between Breastfeeding and Childhood Obesity: A Meta-Analysis. *BMC Public Health* **2014**, *14*, 1267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Miller, J.E.; Goldacre, R.; Moore, H.C.; Zeltzer, J.; Knight, M.; Morris, C.; Nowell, S.; Wood, R.; Carter, K.W.; Fathima, P.; et al. Mode of Birth and Risk of Infection-Related Hospitalisation in Childhood: A Population Cohort Study of 7.17 Million Births from 4 High-Income Countries. *PLoS Med.* **2020**, *17*, e1003429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Surlis, C.; McNamara, K.; O'Hara, E.; Waters, S.; Beltman, M.; Cassidy, J.; Kenny, D. Birth Delivery Method Affects Expression of Immune Genes in Lung and Jejunum Tissue of Neonatal Beef Calves. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*. [[CrossRef](#)]
109. Rendina, D.N.; Lubach, G.R.; Phillips, G.J.; Lyte, M.; Coe, C.L. Maternal and Breast Milk Influences on the Infant Gut Microbiome, Enteric Health and Growth Outcomes of Rhesus Monkeys. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2019**, *69*, 363–369. [[CrossRef](#)]
110. Knoop, K.A.; Gustafsson, J.K.; McDonald, K.G.; Kulkarni, D.H.; Coughlin, P.E.; McCrate, S.; Kim, D.; Hsieh, C.-S.; Hogan, S.P.; Elson, C.O.; et al. Microbial Antigen Encounter during a Prewaning Interval Is Critical for Tolerance to Gut Bacteria. *Sci. Immunol.* **2017**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Torow, N.; Dittrich-Breiholz, O.; Hornef, M.W. Transcriptional Profiling of Intestinal CD4+ T Cells in the Neonatal and Adult Mice. *Genom. Data* **2015**, *5*, 371–374. [[CrossRef](#)]
112. Scharschmidt, T.C.; Vasquez, K.S.; Truong, H.-A.; Gearty, S.V.; Pauli, M.L.; Nosbaum, A.; Gratz, I.K.; Otto, M.; Moon, J.J.; Liese, J.; et al. A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity* **2015**, *43*, 1011–1021. [[CrossRef](#)]
113. Gollwitzer, E.S.; Saglani, S.; Trompette, A.; Yadava, K.; Sherburn, R.; McCoy, K.D.; Nicod, L.P.; Lloyd, C.M.; Marsland, B.J. Lung Microbiota Promotes Tolerance to Allergens in Neonates via PD-L1. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 642–647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Olszak, T.; An, D.; Zeissig, S.; Vera, M.P.; Richter, J.; Franke, A.; Glickman, J.N.; Siebert, R.; Baron, R.M.; Kasper, D.L.; et al. Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. *Science* **2012**, *336*, 489–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Ebersole, J.L.; Holt, S.C.; Delaney, J.E. Acquisition of Oral Microbes and Associated Systemic Responses of Newborn Nonhuman Primates. *Clin. Vaccine Immunol.* **2014**, *21*, 21–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Krusche, J.; Basse, S.; Schaub, B. Role of Early Life Immune Regulation in Asthma Development. *Semin. Immunopathol.* **2020**, *42*, 29–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Calder, P.C.; Krauss-Etschmann, S.; de Jong, E.C.; Dupont, C.; Frick, J.-S.; Frokiaer, H.; Heinrich, J.; Garn, H.; Koletzko, S.; Lack, G.; et al. Early Nutrition and Immunity—Progress and Perspectives. *Br. J. Nutr.* **2006**, *96*, 774–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Clemente, J.C.; Ursell, L.K.; Parfrey, L.W.; Knight, R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* **2012**, *148*, 1258–1270. [[CrossRef](#)]
119. Smith, K.; McCoy, K.D.; Macpherson, A.J. Use of Axenic Animals in Studying the Adaptation of Mammals to Their Commensal Intestinal Microbiota. *Semin. Immunol.* **2007**, *19*, 59–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Umesaki, Y.; Okada, Y.; Matsumoto, S.; Imaoka, A.; Setoyama, H. Segmented Filamentous Bacteria Are Indigenous Intestinal Bacteria That Activate Intraepithelial Lymphocytes and Induce MHC Class II Molecules and Fucosyl Asialo GM1 Glycolipids on the Small Intestinal Epithelial Cells in the Ex-Germ-Free Mouse. *Microbiol. Immunol.* **1995**, *39*, 555–562. [[CrossRef](#)]
121. Umesaki, Y.; Setoyama, H.; Matsumoto, S.; Okada, Y. Expansion of Alpha Beta T-Cell Receptor-Bearing Intestinal Intraepithelial Lymphocytes after Microbial Colonization in Germ-Free Mice and Its Independence from Thymus. *Immunology* **1993**, *79*, 32–37.
122. Cahenzli, J.; Köller, Y.; Wyss, M.; Geuking, M.B.; McCoy, K.D. Intestinal Microbial Diversity during Early-Life Colonization Shapes Long-Term IgE Levels. *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 559–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Schulfer, A.F.; Battaglia, T.; Alvarez, Y.; Bijmens, L.; Ruiz, V.E.; Ho, M.; Robinson, S.; Ward, T.; Cox, L.M.; Rogers, A.B.; et al. Intergenerational Transfer of Antibiotic-Perturbed Microbiota Enhances Colitis in Susceptible Mice. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 234–242. [[CrossRef](#)]
124. Miyoshi, J.; Bobe, A.M.; Miyoshi, S.; Huang, Y.; Hubert, N.; Delmont, T.O.; Chang, E.B. Peripartum Antibiotics Promote Gut Dysbiosis, Loss of Immune Tolerance, and Inflammatory Bowel Disease in Genetically Prone Offspring. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 491–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Sidener, H.M.; Park, B.; Gao, L. Effect of Antibiotic Administration during Infancy on Growth Curves through Young Adulthood in Rhesus Macaques (*Macaca Mulatta*). *Comp. Med.* **2017**, *67*, 270–276. [[PubMed](#)]
126. Janiak, M.C.; Montague, M.J.; Villamil, C.I.; Stock, M.K.; Trujillo, A.E.; DePasquale, A.N.; Orkin, J.D.; Bauman Surratt, S.E.; Gonzalez, O.; Platt, M.L.; et al. Age and Sex-Associated Variation in the Multi-Site Microbiome of an Entire Social Group of Free-Ranging Rhesus Macaques. *Microbiome* **2021**, *9*. [[CrossRef](#)]
127. Park, H.-K.; Shim, S.-S.; Kim, S.-Y.; Park, J.-H.; Park, S.-E.; Kim, H.-J.; Kang, B.-C.; Kim, C.-M. Molecular Analysis of Colonized Bacteria in a Human Newborn Infant Gut. *J. Microbiol.* **2005**, *43*, 345–353. [[PubMed](#)]

128. Perez, P.F.; Dore, J.; Leclerc, M.; Levenez, F.; Benyacoub, J.; Serrant, P.; Segura-Roggero, I.; Schiffrin, E.J.; Donnet-Hughes, A. Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *Pediatrics* **2007**, *119*, e724–e732. [[CrossRef](#)]
129. Al Nabhani, Z.; Eberl, G. Imprinting of the Immune System by the Microbiota Early in Life. *Mucosal Immunol.* **2020**, *13*, 183–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Arrieta, M.-C.; Stiemsma, L.T.; Dimitriu, P.A.; Thorson, L.; Russell, S.; Yurist-Doutsch, S.; Kuzeljevic, B.; Gold, M.J.; Britton, H.M.; Lefebvre, D.L.; et al. Early Infancy Microbial and Metabolic Alterations Affect Risk of Childhood Asthma. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 307ra152. [[CrossRef](#)]
131. Tamburini, S.; Shen, N.; Wu, H.C.; Clemente, J.C. The Microbiome in Early Life: Implications for Health Outcomes. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 713–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Tanaka, M.; Nakayama, J. Development of the Gut Microbiota in Infancy and Its Impact on Health in Later Life. *Allergol. Int.* **2017**, *66*, 515–522. [[CrossRef](#)]
133. Molès, J.-P.; Tuailon, E.; Kankasa, C.; Bedin, A.-S.; Nagot, N.; Marchant, A.; McDermid, J.M.; Van de Perre, P. Breastmilk Cell Trafficking Induces Microchimerism-Mediated Immune System Maturation in the Infant. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2018**, *29*, 133–143. [[CrossRef](#)]
134. Admyre, C.; Johansson, S.M.; Qazi, K.R.; Filén, J.-J.; Lahesmaa, R.; Norman, M.; Neve, E.P.A.; Scheynius, A.; Gabrielsson, S. Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 1969–1978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Catassi, C.; Bonucci, A.; Coppa, G.V.; Carlucci, A.; Giorgi, P.L. Intestinal Permeability Changes during the First Month: Effect of Natural versus Artificial Feeding. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1995**, *21*, 383–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Gomez-Gallego, C.; Garcia-Mantrana, I.; Salminen, S.; Collado, M.C. The Human Milk Microbiome and Factors Influencing Its Composition and Activity. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2016**, *21*, 400–405. [[CrossRef](#)]
137. Fernández, L.; Langa, S.; Martín, V.; Maldonado, A.; Jiménez, E.; Martín, R.; Rodríguez, J.M. The Human Milk Microbiota: Origin and Potential Roles in Health and Disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Yang, Z.; Jiang, R.; Chen, Q.; Wang, J.; Duan, Y.; Pang, X.; Jiang, S.; Bi, Y.; Zhang, H.; Lönnerdal, B.; et al. Concentration of Lactoferrin in Human Milk and Its Variation during Lactation in Different Chinese Populations. *Nutrients* **2018**, *10*, 1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Muletz-Wolz, C.R.; Kurata, N.P.; Himschoot, E.A.; Wenker, E.S.; Quinn, E.A.; Hinde, K.; Power, M.L.; Fleischer, R.C. Diversity and Temporal Dynamics of Primate Milk Microbiomes. *Am. J. Primatol.* **2019**, *81*, e22994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Castellote, C.; Casillas, R.; Ramírez-Santana, C.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M.; Moretones, M.G.; López-Sabater, M.C.; Franch, A. Premature Delivery Influences the Immunological Composition of Colostrum and Transitional and Mature Human Milk. *J. Nutr.* **2011**, *141*, 1181–1187. [[CrossRef](#)]
141. Oikonomou, G.; Addis, M.F.; Chassard, C.; Nader-Macias, M.E.F.; Grant, I.; Delbès, C.; Bogni, C.I.; Le Loir, Y.; Even, S. Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About? *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
142. Pärnänen, K.; Karkman, A.; Hultman, J.; Lyra, C.; Bengtsson-Palme, J.; Larsson, D.G.J.; Rautava, S.; Isolauri, E.; Salminen, S.; Kumar, H.; et al. Maternal Gut and Breast Milk Microbiota Affect Infant Gut Antibiotic Resistome and Mobile Genetic Elements. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Laouar, A. Maternal Leukocytes and Infant Immune Programming during Breastfeeding. *Trends Immunol.* **2020**, *41*, 225–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Koch, S.; Hufnagel, M.; Theilacker, C.; Huebner, J. Enterococcal Infections: Host Response, Therapeutic, and Prophylactic Possibilities. *Vaccine* **2004**, *22*, 822–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Glocker, E.-O.; Kotlarz, D.; Boztug, K.; Gertz, E.M.; Schäffer, A.A.; Noyan, F.; Perro, M.; Diestelhorst, J.; Allroth, A.; Murugan, D.; et al. Inflammatory Bowel Disease and Mutations Affecting the Interleukin-10 Receptor. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 2033–2045. [[CrossRef](#)]
146. Lönnerdal, B. Bioactive Proteins in Human Milk: Mechanisms of Action. *J. Pediatr.* **2010**, *156*, S26–S30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Gopalakrishna, K.P.; Macadangdang, B.R.; Rogers, M.B.; Tometich, J.T.; Firek, B.A.; Baker, R.; Ji, J.; Burr, A.H.P.; Ma, C.; Good, M.; et al. Maternal IgA Protects against the Development of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1110–1115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Bergström, A.; Skov, T.H.; Bahl, M.I.; Roager, H.M.; Christensen, L.B.; Ejlerskov, K.T.; Mølgaard, C.; Michaelsen, K.F.; Licht, T.R. Establishment of Intestinal Microbiota during Early Life: A Longitudinal, Explorative Study of a Large Cohort of Danish Infants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 2889–2900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Ma, J.; Li, Z.; Zhang, W.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Mei, H.; Zhuo, N.; Wang, H.; Wang, L.; Wu, D. Comparison of Gut Microbiota in Exclusively Breast-Fed and Formula-Fed Babies: A Study of 91 Term Infants. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Dettmer, A.M.; Allen, J.M.; Jaggars, R.M.; Bailey, M.T. A Descriptive Analysis of Gut Microbiota Composition in Differentially-Reared Infant Rhesus Monkeys (*Macaca Mulatta*) across the First Six Months of Life. *Am. J. Primatol.* **2019**, *81*, e22969. [[CrossRef](#)]
151. Ardeshir, A.; Narayan, N.R.; Méndez-Lagares, G.; Lu, D.; Rauch, M.; Huang, Y.; Rompay, K.K.A.V.; Lynch, S.V.; Hartigan-O'Connor, D.J. Breast-Fed and Bottle-Fed Infant Rhesus Macaques Develop Distinct Gut Microbiotas and Immune Systems. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 252ra120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Narayan, N.R.; Méndez-Lagares, G.; Ardeshir, A.; Lu, D.; Van Rompay, K.K.A.; Hartigan-O'Connor, D.J. Persistent Effects of Early Infant Diet and Associated Microbiota on the Juvenile Immune System. *Gut Microbes* **2015**, *6*, 284–289. [[CrossRef](#)]

153. Koenig, J.E.; Spor, A.; Scalfone, N.; Fricker, A.D.; Stombaugh, J.; Knight, R.; Angenent, L.T.; Ley, R.E. Succession of Microbial Consortia in the Developing Infant Gut Microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4578–4585. [CrossRef]
154. Laursen, M.F.; Bahl, M.I.; Michaelsen, K.F.; Licht, T.R. First Foods and Gut Microbes. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*. [CrossRef] [PubMed]
155. Magne, F.; Hachelaf, W.; Suau, A.; Boudraa, G.; Mangin, I.; Touhami, M.; Bouziane-Nedjadi, K.; Pochart, P. A Longitudinal Study of Infant Faecal Microbiota during Weaning. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *58*, 563–571. [CrossRef]
156. Al Nabhani, Z.; Dulauroy, S.; Marques, R.; Cousu, C.; Al Bounny, S.; Déjardin, F.; Sparwasser, T.; Bérard, M.; Cerf-Bensussan, N.; Eberl, G. A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. *Immunity* **2019**, *50*, 1276–1288.e5. [CrossRef] [PubMed]
157. Mao, K.; Baptista, A.P.; Tamoutounour, S.; Zhuang, L.; Bouladoux, N.; Martins, A.J.; Huang, Y.; Gerner, M.Y.; Belkaid, Y.; Germain, R.N. Innate and Adaptive Lymphocytes Sequentially Shape the Gut Microbiota and Lipid Metabolism. *Nature* **2018**, *554*, 255–259. [CrossRef] [PubMed]
158. Vatanen, T.; Kostic, A.D.; d’Hennezel, E.; Siljander, H.; Franzosa, E.A.; Yassour, M.; Kolde, R.; Vlamakis, H.; Arthur, T.D.; Hämäläinen, A.-M.; et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell* **2016**, *165*, 842–853. [CrossRef]
159. Ivarsson, A.; Persson, L.A.; Nyström, L.; Ascher, H.; Cavell, B.; Danielsson, L.; Danaeus, A.; Lindberg, T.; Lindquist, B.; Stenhammar, L.; et al. Epidemic of Coeliac Disease in Swedish Children. *Acta Paediatr.* **2000**, *89*, 165–171. [CrossRef]
160. Ivarsson, A.; Myléus, A.; Norström, F.; van der Pals, M.; Rosén, A.; Högberg, L.; Danielsson, L.; Halvarsson, B.; Hammarroth, S.; Hernell, O.; et al. Prevalence of Childhood Celiac Disease and Changes in Infant Feeding. *Pediatrics* **2013**, *131*, e687–e694. [CrossRef]
161. Chassin, C.; Kocur, M.; Pott, J.; Duerr, C.U.; Gütle, D.; Lotz, M.; Hornef, M.W. MiR-146a Mediates Protective Innate Immune Tolerance in the Neonate Intestine. *Cell Host Microbe* **2010**, *8*, 358–368. [CrossRef]
162. Ma, J.; Prince, A.L.; Bader, D.; Hu, M.; Ganu, R.; Baquero, K.; Blundell, P.; Alan Harris, R.; Frias, A.E.; Grove, K.L.; et al. High-Fat Maternal Diet during Pregnancy Persistently Alters the Offspring Microbiome in a Primate Model. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3889. [CrossRef]
163. Vaccines and Immunization. Available online: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/vaccines-and-immunization> (accessed on 28 March 2021).
164. Vaccine Scheduler | ECDC. Available online: <https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/> (accessed on 28 March 2021).
165. Magwira, C.A.; Taylor, M.B. Composition of Gut Microbiota and Its Influence on the Immunogenicity of Oral Rotavirus Vaccines. *Vaccine* **2018**, *36*, 3427–3433. [CrossRef]
166. Ritz, N.; Mui, M.; Balloch, A.; Curtis, N. Non-Specific Effect of Bacille Calmette-Guérin Vaccine on the Immune Response to Routine Immunisations. *Vaccine* **2013**, *31*, 3098–3103. [CrossRef] [PubMed]
167. Zimmermann, P.; Curtis, N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*. [CrossRef] [PubMed]
168. Vlasova, A.N.; Takanashi, S.; Miyazaki, A.; Rajashekara, G.; Saif, L.J. How the Gut Microbiome Regulates Host Immune Responses to Viral Vaccines. *Curr. Opin. Virol.* **2019**, *37*, 16–25. [CrossRef] [PubMed]
169. Zimmermann, P.; Curtis, N. The Influence of Probiotics on Vaccine Responses—A Systematic Review. *Vaccine* **2018**, *36*, 207–213. [CrossRef]
170. Mullié, C.; Yazourh, A.; Thibault, H.; Odou, M.-F.; Singer, E.; Kalach, N.; Kremp, O.; Romond, M.-B. Increased Poliovirus-Specific Intestinal Antibody Response Coincides with Promotion of *Bifidobacterium Longum-Infantis* and *Bifidobacterium Breve* in Infants: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Pediatr. Res.* **2004**, *56*, 791–795. [CrossRef]
171. Huda, M.N.; Lewis, Z.; Kalanetra, K.M.; Rashid, M.; Ahmad, S.M.; Raqib, R.; Qadri, F.; Underwood, M.A.; Mills, D.A.; Stephensen, C.B. Stool Microbiota and Vaccine Responses of Infants. *Pediatrics* **2014**, *134*, e362–e372. [CrossRef] [PubMed]
172. Harris, V.C.; Armah, G.; Fuentes, S.; Korpela, K.E.; Parashar, U.; Victor, J.C.; Tate, J.; de Weerth, C.; Giaquinto, C.; Wiersinga, W.J.; et al. Significant Correlation Between the Infant Gut Microbiome and Rotavirus Vaccine Response in Rural Ghana. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 34–41. [CrossRef] [PubMed]
173. Zhao, T.; Li, J.; Fu, Y.; Ye, H.; Liu, X.; Li, G.; Yang, X.; Yang, J. Influence of Gut Microbiota on Mucosal IgA Antibody Response to the Polio Vaccine. *NPJ Vaccines* **2020**, *5*, 47. [CrossRef]
174. Williams, W.B.; Han, Q.; Haynes, B.F. Cross-Reactivity of HIV Vaccine Responses and the Microbiome. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2018**, *13*, 9–14. [CrossRef]
175. Ang, L.; Arbolea, S.; Lihua, G.; Chuihui, Y.; Nan, Q.; Suarez, M.; Solís, G.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Gueimonde, M. The Establishment of the Infant Intestinal Microbiome Is Not Affected by Rotavirus Vaccination. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 7417. [CrossRef]
176. García-López, R.; Pérez-Brocal, V.; Díez-Domingo, J.; Moya, A. Gut Microbiota in Children Vaccinated with Rotavirus Vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2012**, *31*, 1300–1302. [CrossRef]
177. Hasegawa, Y.; Curtis, B.; Yutuc, V.; Rulien, M.; Morrisroe, K.; Watkins, K.; Ferrier, C.; English, C.; Hewitson, L.; Slupsky, C.M. Microbial Structure and Function in Infant and Juvenile Rhesus Macaques Are Primarily Affected by Age, Not Vaccination Status. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. [CrossRef] [PubMed]

178. Elizaldi, S.R.; Verma, A.; Walter, K.A.; Rolston, M.; Dinasarapu, A.R.; Durbin-Johnson, B.P.; Settles, M.; Kozlowski, P.A.; Raeman, R.; Iyer, S.S. Rectal Microbiome Composition Correlates with Humoral Immunity to HIV-1 in Vaccinated Rhesus Macaques. *mSphere* **2019**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Musich, T.; Thovarai, V.; Venzon, D.J.; Mohanram, V.; Tuero, I.; Miller-Novak, L.K.; Helmold Hait, S.; Rahman, M.A.; Hunegnaw, R.; Huiting, E.; et al. A Prime/Boost Vaccine Regimen Alters the Rectal Microbiome and Impacts Immune Responses and Viremia Control Post-Simian Immunodeficiency Virus Infection in Male and Female Rhesus Macaques. *J. Virol.* **2020**, *94*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Han, Q.; Bradley, T.; Williams, W.B.; Cain, D.W.; Montefiori, D.C.; Saunders, K.O.; Parks, R.J.; Edwards, R.W.; Ferrari, G.; Mueller, O.; et al. Neonatal Rhesus Macaques Have Distinct Immune Cell Transcriptional Profiles Following HIV Envelope Immunization. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 1553–1569.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Koren, O.; Goodrich, J.K.; Cullender, T.C.; Spor, A.; Laitinen, K.; Bäckhed, H.K.; Gonzalez, A.; Werner, J.J.; Angenent, L.T.; Knight, R.; et al. Host Remodeling of the Gut Microbiome and Metabolic Changes during Pregnancy. *Cell* **2012**, *150*, 470–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Edwards, S.M.; Cunningham, S.A.; Dunlop, A.L.; Corwin, E.J. The Maternal Gut Microbiome during Pregnancy. *MCN Am. J. Matern. Child Nurs.* **2017**, *42*, 310–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Sohn, K.; Underwood, M.A. Prenatal and Postnatal Administration of Prebiotics and Probiotics. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2017**, *22*, 284–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Freitas, A.C.; Bocking, A.; Hill, J.E.; Money, D.M.; VOGUE Research Group. Increased Richness and Diversity of the Vaginal Microbiota and Spontaneous Preterm Birth. *Microbiome* **2018**, *6*, 117. [[CrossRef](#)]
185. Brantsaeter, A.L.; Myhre, R.; Haugen, M.; Myking, S.; Sengpiel, V.; Magnus, P.; Jacobsson, B.; Meltzer, H.M. Intake of Probiotic Food and Risk of Preeclampsia in Primiparous Women: The Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* **2011**, *174*, 807–815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Myhre, R.; Brantsaeter, A.L.; Myking, S.; Gjessing, H.K.; Sengpiel, V.; Meltzer, H.M.; Haugen, M.; Jacobsson, B. Intake of Probiotic Food and Risk of Spontaneous Preterm Delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *93*, 151. [[CrossRef](#)]
187. Vitali, B.; Cruciani, F.; Baldassarre, M.E.; Capursi, T.; Spisni, E.; Valerii, M.C.; Candela, M.; Turrone, S.; Brigidi, P. Dietary Supplementation with Probiotics during Late Pregnancy: Outcome on Vaginal Microbiota and Cytokine Secretion. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 236. [[CrossRef](#)]
188. Lindsay, K.L.; Kennelly, M.; Culliton, M.; Smith, T.; Maguire, O.C.; Shanahan, F.; Brennan, L.; McAuliffe, F.M. Probiotics in Obese Pregnancy Do Not Reduce Maternal Fasting Glucose: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial (Probiotics in Pregnancy Study). *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *99*, 1432–1439. [[CrossRef](#)]
189. Jarde, A.; Lewis-Mikhael, A.-M.; Moayyedi, P.; Stearns, J.C.; Collins, S.M.; Beyene, J.; McDonald, S.D. Pregnancy Outcomes in Women Taking Probiotics or Prebiotics: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* **2018**, *18*. [[CrossRef](#)]
190. Veščičik, P.; Kacerovská Musilová, I.; Stráník, J.; Štěpán, M.; Kacerovský, M. Lactobacillus Crispatus Dominant Vaginal Microbiota in Pregnancy. *Ceska Gynekol.* **2020**, *85*, 67–70. [[PubMed](#)]
191. Brace, R.A. Physiology of Amniotic Fluid Volume Regulation. *Clin. Obstet. Gynecol.* **1997**, *40*, 280–289.
192. Underwood, M.A.; Gilbert, W.M.; Sherman, M.P. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *J. Perinatol.* **2005**, *25*, 341–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Van Elburg, R.M.; Fetter, W.P.F.; Bunkers, C.M.; Heymans, H.S.A. Intestinal Permeability in Relation to Birth Weight and Gestational and Postnatal Age. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **2003**, *88*, F52–F55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Jeurink, P.V.; van Bergenhenegouwen, J.; Jiménez, E.; Knippels, L.M.J.; Fernández, L.; Garssen, J.; Knol, J.; Rodríguez, J.M.; Martín, R. Human Milk: A Source of More Life than We Imagine. *Benef. Microbes* **2013**, *4*, 17–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Rodríguez, J.M. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? *Adv. Nutr.* **2014**, *5*, 779–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Toscano, M.; De Grandi, R.; Grossi, E.; Drago, L. Role of the Human Breast Milk-Associated Microbiota on the Newborns' Immune System: A Mini Review. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2100. [[CrossRef](#)]
197. He, X.; Slupsky, C.M.; Dekker, J.W.; Haggarty, N.W.; Lönnerdal, B. Integrated Role of Bifidobacterium Animalis Subsp. Lactis Supplementation in Gut Microbiota, Immunity, and Metabolism of Infant Rhesus Monkeys. *mSystems* **2016**, *1*. [[CrossRef](#)]
198. Golos, T.G. Pregnancy Initiation in the Rhesus Macaque: Towards Functional Manipulation of the Maternal-Fetal Interface. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2004**, *2*, 35. [[CrossRef](#)]
199. Swartwout, B.; Luo, X.M. Implications of Probiotics on the Maternal-Neonatal Interface: Gut Microbiota, Immunomodulation, and Autoimmunity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Isolauri, E.; Joensuu, J.; Suomalainen, H.; Luomala, M.; Vesikari, T. Improved Immunogenicity of Oral D x RRV Reassortant Rotavirus Vaccine by Lactobacillus Casei GG. *Vaccine* **1995**, *13*, 310–312. [[CrossRef](#)]
201. Björkstén, B. Diverse Microbial Exposure—Consequences for Vaccine Development. *Vaccine* **2012**, *30*, 4336–4340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Wu, B.-B.; Yang, Y.; Xu, X.; Wang, W.-P. Effects of Bifidobacterium Supplementation on Intestinal Microbiota Composition and the Immune Response in Healthy Infants. *World J. Pediatr.* **2016**, *12*, 177–182. [[CrossRef](#)]
203. Jarrett, P.; Meczner, A.; Costeloe, K.; Fleming, P. Historical Aspects of Probiotic Use to Prevent Necrotising Enterocolitis in Preterm Babies. *Early Hum. Dev.* **2019**, *135*, 51–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Annexe 4 : Résumés de thèse

Résumé en français

Au niveau des muqueuses du tractus reproducteur féminin (TRF), de nombreux facteurs de l'environnement déterminent la susceptibilité aux infections sexuellement transmissibles (IST). Ces facteurs incluent le liquide séminal (LS), les co-infections, ou encore la composition du microbiote vaginal (MV) qui peuvent moduler l'inflammation. L'inflammation génitale est peu étudiée dans le cadre de co-infections. En particulier, le phénotype et les fonctions des neutrophiles sont très peu décrits au niveau du TRF. L'objectif de ce projet de thèse était d'étudier l'impact de ces facteurs sur l'inflammation génitale, en analysant le rôle du MV, des populations de neutrophiles et des profils de cytokines sur la susceptibilité aux IST incluant les co-infections *Chlamydia trachomatis* (CT)/VIH-1 et sur les réponses immunitaires associées.

Deux approches complémentaires ont été développées, *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, des cellules épithéliales endocervicales humaines (A2EN) ont été exposées ou non à CT en présence ou non de facteurs de l'environnement du TRF (LS ou bactéries du MV). Le profil cytokinique des surnageants (SN) des différentes conditions a été caractérisé puis l'impact des SN a été testé sur l'infection VIH-1. En parallèle, nous avons étudié l'impact de ces SN sur le phénotype et les fonctions (survie, phagocytose, production de ROS) de neutrophiles humains isolés du sang périphérique. *In vivo*, les neutrophiles ont été suivis en longitudinal chez 9 femelles macaques cynomolgus, dans le sang et en vaginal au cours de 3 cycles menstruels en parallèle aux profils de cytokines et à la composition du microbiote. Dans une 2nde étude, 12 femelles macaques cynomolgus ont été exposées à CT après modification de leur microbiote vaginal. Ces 2 études ont servi de base pour une 3^{ème} étude dans laquelle 9 femelles macaques cynomolgus ont reçu 1 puis 4 doses de LS en intravaginal, puis elles ont été exposées ou non à CT, en présence ou non de LS. A chaque étape, nous avons analysé différents marqueurs de l'inflammation : neutrophiles et profils de cytokines. Les réponses immunitaires innées et spécifiques ont été étudiées à l'euthanasie en systémique et dans les différents compartiments muqueux du TRF.

Résultats *in vitro* : La présence de bactéries du MV modifie le profil de cytokines induites par l'infection CT des cellules A2EN.

La présence de LS inhibe l'infection CT des cellules A2EN. Le profil cytokinique des cellules A2EN infectées par CT dépend de la dilution du LS.

Dans les conditions expérimentales testées, les SN des différentes conditions n'ont pas d'impact sur la susceptibilité au VIH-1. En revanche, les SN ont un impact sur l'activation des neutrophiles et l'expression de CD62L. Les SN des différentes conditions ont

également un impact sur la survie et la fonction de phagocytose des neutrophiles. Des différences sont observées en termes de survie entre certaines conditions expérimentales et peu de différences en terme de phagocytose.

Résultats *in vivo* : Le cycle menstruel affecte la composition du MV, des profils de cytokines et des populations de neutrophiles au niveau vaginal. Les menstruations induisent un fort niveau d'inflammation.

L'exposition des femelles macaques à une faible dose répétée de CT n'entraîne pas une infection persistante. L'exposition CT a un impact sur le MV, les profils de cytokines au niveau vaginal, et sur les sous-populations de neutrophiles au niveau sanguin.

Une inoculation intravaginale de LS induit une forte inflammation génitale, mais pas des doses répétées de LS. Le LS augmente la présence de NET dans les fluides vaginaux. Le LS modifie la réponse immunitaire à l'infection CT en termes de production de cytokines. En présence de LS, CT induit un recrutement de lymphocytes au niveau vaginal.

Conclusion : L'ensemble de ces résultats permet de mieux comprendre le rôle de l'environnement sur l'inflammation au niveau du TRF et les conséquences sur l'acquisition des IST.

Résumé en anglais

In the female reproductive tract (FRT) mucosa, many environmental factors determine the susceptibility to sexually transmitted infections (STI), directly or indirectly, by modulating the inflammation. Such factors include the seminal plasma (SP), co-infections, or even the composition of the vaginal microbiota. However, the role of inflammation at the level of FRT is poorly studied in the context of co-infections. Specifically, the phenotypes and functions of neutrophils have poorly been described at the level of the FRT. The objective of this PhD's project was to study the impact of these factors on the inflammation in the FRT, by analyzing the role of the vaginal microbiota, neutrophil populations and cytokine profiles on the susceptibility to STI including *Chlamydia trachomatis* (CT)/HIV-1 co-infections and on the associated immune responses.

Two complementary approaches were developed *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, a human endocervical epithelial cell line (A2EN) was exposed or not to CT in the presence or absence of factors from the FRT environment (SP or bacteria from the microbiota). The supernatants (SN) in the different conditions were recovered, their cytokine profile was characterized, and their impact was tested on HIV-1 infection. In parallel, the impact of these same SN was studied on the phenotype and functions (survival, phagocytosis, ROS production) of human neutrophils isolated from the peripheral blood. *In vivo*, neutrophils

were monitored longitudinally in 9 female cynomolgus macaques, in the blood and vaginally during 3 menstrual cycles (study PHY1907) in parallel to the cytokine profiles and the composition of the microbiota. In a 2nd study (THE2002), 12 female cynomolgus macaques were exposed to CT after modification of the vaginal microbiota composition. These 2 studies served as the basis for a third study (PHY2108) in which 9 female cynomolgus macaques received 1 then 4 doses of SP intravaginally. After that, they were exposed or not to CT, in the presence or not of SP. At each step, we analyzed different markers of the inflammation: neutrophils and cytokine profiles. Innate and specific immune responses were studied in the blood and in the different mucosal compartments of the FRT.

***In vitro* results:** The presence of bacteria from the microbiota modified the profile of cytokines induced by CT infection of A2EN cells.

The presence of SP inhibited CT infection of A2EN cells. The cytokine profile of A2EN cells infected with CT depended on the dilution of SP: at low dilutions, the effect of LS dominated, at high dilutions, the effect of CT dominated.

In the tested experimental conditions, the SN had no impact on the susceptibility to HIV-1. On the other hand, SN had an impact on neutrophil activation and CD62L expression. Different levels of expression of phenotypic markers were observed depending on the experimental conditions. The SN in the different conditions also impacted neutrophil survival and phagocytosis function. Differences were observed in terms of survival between certain experimental conditions and few differences in terms of phagocytosis.

***In vivo* results:** The menstrual cycle affected the composition of the microbiota, cytokine profiles and neutrophil subpopulations in the vagina. Menses induce a high level of inflammation.

A repeated CT low dose exposure of female cynomolgus macaques did not result in a persistent infection. CT exposure impacted the microbiota and cytokine profiles in the vagina, and neutrophil populations in the blood.

Intravaginal inoculation of SP induced a strong genital inflammation, but not repeated doses of SP. SP increased the presence of NET in vaginal fluids. SP modified the immune response to CT infection in terms of cytokine production. In the presence of SP, CT induces lymphocyte recruitment in the vaginal.

Conclusion: Altogether these results allow to better understand the role of the local environment on the FRT inflammation level and the consequences for STI acquisition.

Titre : Contrôle des infections sexuellement transmissibles au niveau du tractus reproducteur féminin

Mots clés : tractus reproducteur féminin, microbiote vaginal, liquide séminal, inflammation, ISTs, contrôle

L'environnement local affecte la susceptibilité aux infections sexuellement transmissibles (IST) au niveau du tractus reproducteur féminin (TRF) en modulant l'inflammation. L'objectif de ce projet était d'étudier l'impact du liquide séminal (LS) et du microbiote vaginal (MV) sur l'inflammation (production de cytokines et phénotype et fonctions des neutrophiles), sur la susceptibilité aux IST et sur les réponses immunitaires associées. *In vitro*, des cellules ont été exposées ou non à CT en présence ou non d'un pool de LS ou de bactéries du MV. Le profil cytokinique dans les surnageants de culture (SN) a été caractérisé. Leur impact sur l'infection VIH-1, le phénotype et les fonctions de neutrophiles ont été testés. *In vivo*, les neutrophiles ont été suivis dans le sang et en vaginal chez 9 femelles macaques, pendant 3 cycles menstruels. Dans une 2^{ème} étude, 9 macaques ont reçu 1 puis 4 doses du pool de LS en intravaginal et ont été exposées ou non à CT, en présence ou non de LS. La réponse immunitaire a

été étudiée en longitudinal et à l'euthanasie. *In vitro*, des bactéries du MV modifient le profil cytokinique de cellules infectées par CT. L'effet du LS sur le profil cytokinique est dose dépendant. Le LS inhibe l'infection CT. Les SN n'ont pas d'impact sur la susceptibilité au VIH-1, mais modifient des marqueurs phénotypiques et les fonctions des neutrophiles. Des différences sont observées sur leur survie et moins sur leur capacité de phagocytose. *In vivo*, 3 populations principales de neutrophiles ont été identifiées au niveau vaginal. Le cycle menstruel affecte la composition du MV, des profils de cytokines et les sous-populations de neutrophiles au niveau vaginal. Les menstruations sont associées à une inflammation élevée. Le LS impacte l'inflammation *in vivo* en condition physiologique et lors d'une infection CT. L'ensemble de ces résultats permet de mieux comprendre le rôle de l'environnement dans l'inflammation au niveau du TRF.

Title: Control of sexually transmitted infections at the level of the female reproductive tract

Keywords : female reproductive tract, vaginal microbiota, seminal plasma, inflammation, STIs, control

Abstract: The local environment affects the susceptibility to sexually transmitted infections (STI) in the female reproductive tract (FRT) by modulating the inflammation. The objective of this project was to study the impact of the seminal plasma (SP) and the vaginal microbiota (VM) on genital inflammation (cytokine production and neutrophil phenotype and functions), on susceptibility to STI and on the associated immune responses. *In vitro*, cells were exposed or not to CT in the presence or absence of a pool of SP or bacteria from the VM. The cytokine profile in the culture supernatants (SN) was characterized. Their impact on HIV-1 infection, on neutrophil phenotype and functions was tested. *In vivo*, neutrophils were monitored in the blood and in the vagina for 9 female macaques, during 3 menstrual cycles. In a 2nd study, 9 macaques received 1 then 4 doses of the SP pool intravaginally and were exposed or not to CT, in the presence or not of SP.

The immune response has been studied longitudinally and at euthanasia. *In vitro*, bacteria from the VM modified the cytokine profile of CT infected cells. The effect of SP on the cytokine profile was dose dependent. SP inhibited CT infection. SN had no impact on HIV-1 susceptibility but modified neutrophil phenotypic markers and functions. Differences were observed on their survival and to a lower extend on their phagocytosis capacity. *In vivo*, 3 main populations of neutrophils have been identified in the FRT. The menstrual cycle affected the VM composition, the cytokine profiles and neutrophil subpopulations in the vagina. Menstruation was associated with a high inflammation. SP impacts genital inflammation *in vivo* in physiological conditions and during CT exposition. All these results allow to better understand the role of the environment in inflammation at the level of the FRT.

Maison du doctorat de l'Université Paris-Saclay
2^{ème} étage aile ouest, Ecole normale supérieure Paris-Saclay
4 avenue des Sciences,
91190 Gif sur Yvette, France