



Université de Montréal

**Étude de l'évolution du tropisme et de la pression sélective  
exercée sur le gène de l'enveloppe du virus de  
l'immunodéficience humaine de type 1 au cours de la  
grossesse et à l'échelle de la population.**

par

Doris Ransy

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

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

Fevrier, 2015

© Doris Ransy, 2015

## Résumé

**Introduction.** Le VIH-1 évolue en fonction de la réponse immunitaire spécifique de l'hôte. La pression sélective exercée par la réponse immunitaire VIH-spécifique de l'hôte entraîne l'évolution des gènes viraux et à terme détermine l'évolution de la maladie. Cette évolution du virus à l'échelle d'un individu façonne également l'évolution du virus à l'échelle de la population et détermine le devenir de l'épidémie. Le VIH utilise les corécepteurs d'entrée CCR5 (virus R5) et CXCR4 (virus X4) afin d'infecter la cellule cible, et l'évolution du tropisme du virus de R5 vers X4, appelé switch du tropisme, est associé à la progression de la maladie. Les virus R5 sont rencontrés en début d'infection tandis que les virus X4 apparaissent en fin de maladie chez un certain nombre de patients et sont considérés comme plus virulents. La pression sélective immunitaire exercée sur le gène de l'enveloppe (*env*) peut donc entraîner l'évolution du tropisme du VIH. La grossesse est un état immunitaire particulier considéré comme étant principalement caractérisé par un biais Th2 nécessaire à l'établissement de la tolérance materno-fœtale. Le switch de tropisme de R5 vers X4 en grossesse n'a jamais été documenté, de même que l'évolution des déterminants du tropisme à l'échelle de la population.

**Hypothèses.** Les changements immunitaires associés à l'initiation et la progression de la grossesse engendrent des changements dans la pression immunitaire exercée sur l'enveloppe et peuvent favoriser le switch du tropisme. L'évolution du tropisme du VIH-1 peut être observé à l'échelle de la population au même titre que l'évolution de l'enveloppe virale.

**Objectifs.** Analyser l'évolution du tropisme et décrire la pression sélective sur l'enveloppe des femmes enceintes infectées par le VIH-1. Analyser l'évolution des déterminants du tropisme à l'échelle de la population.

**Méthodes.** Nous avons dans un premier temps analysé l'évolution des déterminants du tropisme et déterminé le génotype et phénotype du VIH-1 chez 19 femmes enceintes issues de la cohorte du centre maternel et infantile sur le SIDA de l'hôpital Sainte-Justine (CMIS). Nous avons ensuite caractérisé et comparé la pression sélective exercée sur *env*, par une méthode bayésienne, chez 31 femmes enceintes et 29 femmes non-enceintes. Enfin, nous avons analysé

et comparé des déterminants du tropisme entre des séquences d'enveloppe contemporaines et anciennes, issues des bases de données du NCBI.

**Résultats.** Nos résultats montrent la présence de virus X4 chez la moitié de notre cohorte, et un switch de tropisme de R5 vers X4 chez 5/19 sujets. Les séquences des femmes enceintes présentaient des taux de substitutions plus élevées que celles des femmes non-enceintes. La pression sélective dans la région C2 était plus faible chez les femmes enceintes que chez les femmes non-enceintes, et différait dans 4 positions entre ces 2 groupes. Cette sélection diminuait au cours de la grossesse chez les patientes traitées. Enfin, une accumulation de mutations X4 a été observée dans les séquences R5 contemporaines par rapport aux séquences R5 anciennes.

**Conclusion.** Les changements immunitaires associés à la grossesse semblent induire des modifications subtiles dans la pression sélective exercée sur *env*, suffisant à influencer l'évolution du tropisme de R5 vers X4. Un switch du tropisme à l'échelle de la population impliquerait une épidémie évoluant vers une plus grande virulence du virus. Nos résultats sont d'importance en ce qui concerne la prophylaxie antirétrovirale pour la santé de la mère et la prévention de la transmission mère-enfant du VIH-1. Ils sont aussi importants concernant l'avenir de la thérapie antirétrovirale dans le contexte d'une épidémie évoluant vers une plus grande virulence

**Mots-clés :** VIH-1, tropisme, grossesse, pression sélective

## Abstract

**Introduction.** HIV-1 evolves as a function of the immune specific response of the host. The selective pressure exerted by HIV-specific immune responses lead to the evolution of the viral genes and ultimately determine the evolution of the disease. HIV evolution at the individual level also shapes the evolution of the virus the population level and determines the future of the epidemic. HIV enters the target cell via CCR5 (R5 viruses) or CXCR4 (X4 viruses) coreceptors, and switch of tropism from R5 to X4, is associated with progression disease. Indeed, R5 virus characterize earlier stages of infection while X4 emerge at later disease stages in some patients and are considered more virulent. The immune pressures exerted on the envelope gene (*env*) can therefore cause HIV coreceptor switch. Pregnancy is considered a particular immune state mainly characterized by a Th2 bias necessary for the establishment of materno-fetal tolerance. Tropism switch from R5 to X4 during pregnancy has never been documented, and changes in the determinants of tropism during the HIV epidemic at the population level have never been reported.

**Hypotheses.** Immune changes associated with initiation and progression of pregnancy generate changes in the immune pressure exerted on *env* and may influence coreceptor tropism switch. The evolution HIV-1 coreceptor tropism can be observed at the population level as well as the evolution of the viral envelope.

**Objectives.** Analyze the evolution of tropism and describe the selective pressure on the envelope of pregnant women infected with HIV-1. Analyze the evolution of the determinants of tropism in at the population level.

**Methods.** We first analyzed the evolution of determinants of tropism and determined the genotype and phenotype of HIV-1 in 19 pregnant women from centre maternel et infantile sur le SIDA de l'hôpital Sainte-Justine (CMIS). We then characterized and compared the selective pressure on *env*, using a Bayesian method, in 31 pregnant and 29 non-pregnant women. Finally, we analyzed and compared the determinants of tropism between contemporary and early envelope sequences retrieved from the NCBI databases.

**Results.** Our results show the presence of X4 virus in half of our cohort, and R5 to X4 tropism switch in 5/19 subjects. Higher substitution rates were found in sequences from pregnant

women as compared to sequences from non-pregnant subjects. Selective pressure in the C2 region was lower in pregnant than in non-pregnant women, and differed in 4 positions between these 2 groups. This selection decreased during pregnancy in patients who received antiretroviral therapy. Finally, accumulation of X4 mutations was observed in contemporary R5 sequences compared to early R5 sequences.

**Conclusion.** Immune changes that are associated with pregnancy appear to induce subtle changes in selective pressures in *env*, changes that may influence the evolution of tropism towards X4. Switch of tropism at the population level would imply an evolving epidemic towards greater virulence. Our results are of importance regarding antiretroviral prophylaxis for the health of the mother and for the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1. These results are also important for the future of antiretroviral therapy in the context of evolving epidemic

**Keywords :** HIV-1, coreceptor tropism, pregnancy, selective pressure

# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| Résumé .....  | i         |
| Abstract.....   | iii       |
| Table des matières .....  | v         |
| Liste des tableaux.....   | x         |
| Liste des figures.....  | xi        |
| Liste des sigles .....  | xiii      |
| Liste des abréviations .....                                    | xv        |
| Remerciements .....   | xvi       |
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                       | <b>17</b> |
| <b>1 Épidémiologie et transmission .....</b>                    | <b>18</b> |
| 1.1. État de la pandémie .....                                  | 18        |
| 1.1. Mode de transmission .....                                 | 19        |
| <b>2 Le virus de l'immunodéficience humaine de type-1 .....</b> | <b>20</b> |
| 2.1. Découverte .....   | 20        |
| 2.2. Origine .....  | 21        |
| 2.3. Virologie.....   | 23        |
| 2.3.1. <i>Architecture de la particule virale.....</i>          | <i>23</i> |
| 2.3.2. <i>Organisation génomique et fonction des gènes.....</i> | <i>24</i> |
| 2.3.3. <i>Le cycle de réplication .....</i>                     | <i>26</i> |
| 2.4. La pathogenèse du VIH-1 .....                              | 29        |
| 2.4.1. <i>La primo-infection ou phase aigüe.....</i>            | <i>29</i> |
| 2.4.2. <i>La phase chronique.....</i>                           | <i>29</i> |
| 2.4.3. <i>Le stade SIDA .....</i>                               | <i>30</i> |
| <b>3 La thérapie antirétrovirale .....</b>                      | <b>32</b> |
| 3.1. Mécanisme d'action des antirétroviraux.....                | 32        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.2.     | Les inhibiteurs de la transcriptase inverse .....                      | 33        |
| 3.3.     | Les inhibiteurs de la protéase .....                                   | 35        |
| 3.4.     | Les inhibiteurs d'entrée.....  | 35        |
| 3.5.     | Inhibiteurs de l'intégrase .....                                       | 36        |
| 3.6.     | La thérapie antirétrovirale combinée (cART) .....                      | 37        |
| <b>4</b> | <b>Diversité génétique du VIH-1 .....</b>                              | <b>37</b> |
| 4.1.     | Origine de la diversité du VIH-1.....                                  | 39        |
| 4.1.1.   | <i>La composante stochastique : mutations et recombinaison.....</i>    | <i>39</i> |
| 4.1.2.   | <i>La composante environnementale : la pression sélective.....</i>     | <i>40</i> |
| <b>5</b> | <b>La glycoprotéine d'enveloppe et l'entrée virale .....</b>           | <b>44</b> |
| 5.1.     | Structure et fonction de l'enveloppe .....                             | 44        |
| 5.1.1.   | <i>Synthèse et modifications post-traductionnelles.....</i>            | <i>45</i> |
| 5.1.2.   | <i>La gp120 .....</i>  | <i>47</i> |
| 5.1.3.   | <i>La gp41.....</i>  | <i>49</i> |
| 5.1.4.   | <i>La glycosylation.....</i>   | <i>51</i> |
| 5.2.     | L'entrée virale.....   | 53        |
| 5.2.1.   | <i>Les récepteurs du VIH-1.....</i>                                    | <i>54</i> |
| 5.2.2.   | <i>Étapes séquentielles de l'entrée virale.....</i>                    | <i>56</i> |
| 5.2.3.   | <i>Les inhibiteurs d'entrée.....</i>                                   | <i>59</i> |
| 5.2.4.   | <i>Antigénicité et immunogénicité de la gp120.....</i>                 | <i>62</i> |
| 5.2.5.   | <i>La réponse anticorps à l'enveloppe au cours de la maladie .....</i> | <i>63</i> |
| <b>6</b> | <b>Le tropisme du VIH-1 .....</b>                                      | <b>64</b> |
| 6.1.     | Utilisation des corécepteurs et tropisme cellulaire .....              | 64        |
| 6.1.1.   | <i>Classification du tropisme.....</i>                                 | <i>64</i> |
| 6.1.2.   | <i>Les cibles cellulaires et relevance pathologique .....</i>          | <i>65</i> |
| 6.1.3.   | <i>Corécepteurs alternatifs.....</i>                                   | <i>67</i> |
| 6.2.     | Le switch du tropisme .....  | 68        |
| 6.2.1.   | <i>Transmission et primo-infection, l'importance de CCR5.....</i>      | <i>68</i> |
| 6.2.2.   | <i>Phase chronique, émergence graduelle des virus X4.....</i>          | <i>70</i> |
| 6.2.3.   | <i>Le stade SIDA, la prédominance des virus X4 .....</i>               | <i>70</i> |
| 6.2.4.   | <i>Le switch chez les différents sous-types.....</i>                   | <i>72</i> |



|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 6.2.5.    | <i>Les diverses hypothèses pouvant expliquer le switch</i> .....           | 72        |
| 6.2.6.    | <i>L'absence de switch</i> .....   | 73        |
| 6.3.      | Les déterminants moléculaires du tropisme .....                            | 73        |
| 6.4.      | Les outils de détermination du tropisme .....                              | 74        |
| 6.4.1.    | <i>Les tests phénotypiques</i> .....                                       | 75        |
| 6.4.2.    | <i>Les tests génotypiques : les algorithmes de prédiction</i> .....        | 77        |
| <b>7</b>  | <b>La transmission mère-enfant du VIH</b> .....                            | <b>79</b> |
| 7.1.      | Historique.....  | 79        |
| 7.2.      | Modes de transmission .....  | 79        |
| 7.3.      | Facteurs de risque de la transmission périnatale.....                      | 80        |
| 7.4.      | Prévention de la TME (PTME) .....  | 81        |
| <b>8</b>  | <b>La grossesse et l'immunité maternelle</b> .....                         | <b>82</b> |
| 8.1.      | La gestation.....  | 82        |
| 8.1.1.    | <i>Déroulement de la grossesse</i> .....                                   | 82        |
| 8.1.2.    | <i>Les hormones stéroïdiennes</i> .....                                    | 82        |
| 8.2.      | L'immunité maternelle.....   | 84        |
| 8.2.1.    | <i>Effets immunomodulateurs de la progestérone et des estrogènes</i> ..... | 84        |
| 8.2.2.    | <i>Le biais Th2</i> .....  | 87        |
| 8.2.3.    | <i>Les maladies infectieuses en grossesse</i> .....                        | 88        |
| 8.2.4.    | <i>Une réponse immunitaire robuste</i> .....                               | 89        |
| <b>9</b>  | <b>Le VIH-1 en grossesse</b> .....   | <b>90</b> |
| 9.1.      | Effet des hormones sexuelles sur le VIH-1 .....                            | 90        |
| 9.1.1.    | <i>Différences sexuelles</i> .....   | 90        |
| 9.1.2.    | <i>Contraceptifs hormonaux</i> .....                                       | 90        |
| 9.1.3.    | <i>Études in vitro et chez le singe</i> .....                              | 91        |
| 9.2.      | Évolution de la maladie chez la femme enceinte .....                       | 91        |
| 9.3.      | Le tropisme en grossesse.....  | 93        |
| 9.3.1.    | <i>Rational du switch en grossesse</i> .....                               | 93        |
| <b>10</b> | <b>Problématiques, hypothèses et objectifs</b> .....                       | <b>96</b> |
| 10.1.     | Le gène de l'enveloppe en grossesse .....                                  | 96        |
| 10.2.     | Le gène de l'enveloppe à l'échelle de la population.....                   | 96        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>CHAPITRE I : EVOLUTION DE L'UTILISATION DES CORECEPTEURS DU VIH-1 ET SWITCH DU TROPISME AU COURS DE LA GROSSESSE.....</b>                             | <b>98</b>  |
| <b>TRANSITION 1.....</b>   | <b>137</b> |
| <b>CHAPITRE II : DIFFERENCES SUBTILES DANS LA PRESSION SELECTIVE EXERCÉE SUR LE GENE DE L'ENVELOPPE CHEZ LES FEMMES ENCEINTES ET NON-ENCEINTES .....</b> | <b>138</b> |
| <b>TRANSITION 2.....</b>   | <b>187</b> |
| <b>CHAPITRE III : EVOLUTION DU TROPISME DU VIH-I À L'ÉCHELLE DE LA POPULATION .....</b>  | <b>189</b> |
| <b>DISCUSSION .....</b>  | <b>214</b> |
| <b>1. Évolution du tropisme du VIH-1 au cours de la grossesse.....</b>   | <b>215</b> |
| 1.1. La présence de séquence X4 est détectée chez la moitié des sujets de notre cohorte .....  | 215        |
| 1.2. L'évolution du tropisme est retrouvé uniquement chez les sujets X4 .....  | 218        |
| 1.3. L'immunité maternelle comme possible potentialisateur du switch en grossesse .....  | 221        |
| 1.4. Limites et perspectives de l'étude .....  | 225        |
| <b>2. Pression sélective exercée sur le gène de l'enveloppe au cours de la grossesse .....</b>   | <b>226</b> |
| 2.1. Cartographie de la pression sélective exercée sur l'enveloppe du VIH-1 chez les femmes chroniquement infectées.....                                 | 227        |
| 2.2. Existe-t-il une réponse immunitaire différentielle à l'enveloppe entre femmes enceintes et non-enceintes?.....                                      | 231        |
| 2.3. Diminution de la pression sélective dans l'enveloppe au cours de la grossesse chez les patientes traitées avec des agents antirétroviraux.....      | 235        |
| 2.4. Limites et perspectives de l'étude .....  | 236        |
| 2.5. Que veulent dire nos résultats en terme d'évolution du tropisme? .....  | 237        |
| <b>3. Limites et perspectives inhérentes aux 2 études évolutives .....</b>   | <b>238</b> |
| <b>4. Évolution adaptative du tropisme du VIH-1 à l'échelle de la population .....</b>   | <b>239</b> |
| 4.1. Augmentation du score PSSM dans les séquences contemporaines.....   | 240        |
| 4.2. L'allongement de V1V2 et l'augmentation du nombre de PNGS sont associés à l'augmentation du score PSSM dans les séquences contemporaines.....       | 241        |

|   |             |
|---|-------------|
| 4.3. Augmentation de l'index de vraisemblance de V2 dans les séquences contemporaines et corrélation avec l'augmentation de la longueur de V1V2 ..... | 243         |
| 4.4. Limites .....  | 244         |
| 4.5. Implications.....  | 244         |
| 4.6. Perspectives.....  | 246         |
| <b>5. Grossesse et tropisme.....</b>  | <b>247</b>  |
| <b>CONCLUSION .....</b>   | <b>251</b>  |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>   | <b>i</b>    |
| <b>ANNEXE : ARTICLE DE REVUE .....</b>  | <b>xliv</b> |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1. Liste des inhibiteurs la transcriptase inverse par ordre d’approbation par la FDA (FDA 2013)..... | 34 |
| Tableau 2. Les inhibiteurs de protéase par ordre d’approbation par la FDA (FDA 2013).....                    | 35 |
| Tableau 3 Les inhibiteurs d’entrée par ordre d’approbation par la FDA (FDA 2013).....                        | 36 |
| Tableau 4. Les inhibiteurs de l’intégrase par ordre d’approbation par la FDA (FDA 2013) ...                  | 36 |
| Tableau 5. Les inhibiteurs d’entrée du VIH-1. ....   | 61 |
| Tableau 6. Tests phénotypiques utilisés pour la détermination du tropisme du VIH-1.....                      | 77 |
| Tableau 7. Évolution de la prophylaxie antirétrovirale à des fins de PTME.....                               | 81 |

## Liste des figures

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1. Prévalence mondiale du VIH-1 en 2013. ....  | 18  |
| Figure 2. Nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH-1 de 1990 à 2010. ....  | 19  |
| Figure 3. Structure de la particule virale du VIH-1. ....   | 24  |
| Figure 4. Organisation du génome du VIH-1. ....   | 26  |
| Figure 5. Cycle répliatif du VIH-1. ....  | 28  |
| Figure 6. La pathogenèse du VIH-1 : Étapes de l'infection suite à l'exposition au virus. ....   | 31  |
| Figure 7. Évolution de la maladie. ....   | 32  |
| Figure 8. Mode d'action des différents agents ARV dans le cycle du VIH-1. ....  | 33  |
| Figure 9. Distribution des sous-types et des recombinaants du VIH-1 dans le monde. La surface relative des zones des camemberts représente le nombre relatif de personnes vivant avec le VIH dans la région. .... | 39  |
| Figure 10. Structure native de l'enveloppe trimérique à la surface des particules virales. ....   | 45  |
| Figure 11. Organisation structurale (A) et représentation schématique (B) du précurseur gp160. ....   | 46  |
| Figure 12. Structure de la gp120, gp41 et du trimère à la surface du virus. ....  | 50  |
| Figure 13. Séquence de la gp120 du VIH-1 et domaines fonctionnels. ....   | 51  |
| Figure 14. Étapes de l'entrée virale. ....  | 58  |
| Figure 15. Relation entre utilisation des corécepteurs, phénotype et tropisme du VIH-1. ....  | 67  |
| Figure 16. Évolution du tropisme au cours de la maladie. ....   | 71  |
| Figure 17. Concentrations plasmatiques moyennes de la progestérone (P) et des estrogènes [œstrone (E1), œstradiol (E2) et œstriol (E3)] au cours de la grossesse. ....  | 84  |
| Figure 18. Effet immunomodulateurs de la progestérone (a) et des estrogènes (b). ....   | 86  |
| Figure 19. Profile d'expression des corécepteurs du VIH-1 en fonction de la polarisation des lymphocytes TCD4+. ....  | 95  |
| Figure 20. Évolution du score PSSM, de la longueur de V1V2 et du nombre de PNGS dans V1V2 au cours des 2 grossesses de la patiente TV715. ....  | 188 |
| Figure 22. Tropisme et caractéristiques cliniques des sujets de notre cohorte. ....   | 217 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 23. Vue d'ensemble de l'évolution du tropisme vers l'utilisation de CXCR4 au cours de la grossesse tel qu'analysé dans notre cohorte.....                         | 221 |
| Figure 24. Représentation schématique des possibles effets de la grossesse sur le tropisme du VIH-1.....   | 224 |
| Figure 25. Représentation tridimensionnelle de l'enveloppe du VIH-1 et des différences dans la pression sélective entre les femmes enceintes et non-enceintes. ....      | 234 |
| Figure 26. Schéma de l'évolution de la longueur de V1V2, du nombre de PNGS dans V1V2 et du tropisme du VIH-1 à l'échelle de la population et au cours de l'épidémie..... | 246 |
| Figure 27. Schéma intégratif de l'évolution du tropisme et de l'influence potentielle de la grossesse. ....  | 250 |

## Liste des sigles

ADN : acide désoxyribo-nucléique  
ARN : acide ribo-nucléique  
ART : thérapie antirétrovirale  
ARV : antirétroviraux  
CADA : cyclotriazadisulfonamide  
cART : thérapie antirétrovirale combinée  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CRF : circulant recombinant form  
DM : dual-mixed  
ESTA : enhanced sensitivity trofile assay  
FPR : false positive rate  
G2P : geno-2-pheno  
GALT : gut associated lymphoid tissu  
HAART : thérapie antirétrovirale hautement active  
HLA : human leukocyte antigen  
HTLV : human T-cell lymphotropic virus  
ICAM : intercellular adhesion molecule  
IE : inhibiteur d'entrée  
IF : inhibiteur de fusion  
II : inhibiteur d'intégrase  
INNTI : inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse  
INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse  
IP : inhibiteur de protéase  
LAV : lymphadenopathy associated virus  
LT : lymphocyte T  
LTC : lymphocytes T cytotoxiques  
LTR : long terminal repeat  
NK : natural killer

OMS : organisation mondiale de la santé  
OTA : original trofile assay  
PIC : pre-integration complex  
PS : positivement sélectionné  
PSSM : position specific scoring matrix  
R5 : virus utilisant le corécepteur CCR5  
RRE : Rev responsive element  
SI : syncitium inducing  
SIDA : syndrome de l'immunodéficience asquise  
SNI : non-syncitium inducing  
SVM : support vector machine  
TAR : trans-activating response element  
TME : transmission mère-enfant  
TTT : test de tropisme de Toulouse  
URF : unique recombinant form  
VIF: virus de l'immunodeficiency féline  
VIH : virus d'immunodeficiency humaine  
VIS : virus de l'immunodéficience simienne  
X4 : virus utilisant le corecepteur CXCR4



## Liste des abréviations

Adj. : Adjectif

Art. : Article

Etc. : Et cætera

Ac : anticorps

AcN : anticorps neutralisants

Th : T helper

## Remerciements

Je tiens avant tout à remercier mon directeur de recherche, Dr Hugo Soudeyngs, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a formé à la recherche au cours de mon doctorat. Il m'a laissé la liberté nécessaire au développement de mes capacités autonomes en recherche, allant de l'élaboration à l'aboutissement de projets.

Je souhaite à remercier les membres du jury, Dr. Jacques Thibodeau, Dr. Bernard Massie et Dre Nancy Dumais, d'avoir pris le temps d'examiner ma thèse de doctorat et de m'avoir donné d'aussi bons retours.

Je voudrais également remercier les membres passés et présents du laboratoire qui m'ont apporté leur soutien et leur aide au fil des années, Martine Caty, Natacha Mérindol, Insaf Salem, Réginald Rénoüs, Catherine Gravel, Élyse Jolette, Virgine Calderon, Silvie Valois, Audrey Janelle-Montcalm, Armelle Le Campion et Ariane Larouche. Particulièrement Martine Caty, qui a su être une oreille attentive et une excellente conseillère surtout au moment le plus difficiles qu'est la fin du doctorat.

Je tiens à remercier mes amis sans qui je n'aurais pu me rendre jusqu'au bout. Yacouba Traoré, mon premier supporteur, qui a toujours cru en moi et m'a apporté un soutien incroyable pendant ces longues années. Natacha Mérindol, amie et collègue au doctorat, son soutien et son aide ont été inestimables, particulièrement à la fin, merci pour ce coup de pouce qui m'a permis de enfin clore ce chapitre. Elodie Rance et Ramatoulaye Bah, qui m'ont également soutenues et apporté leur aide précieuse aussi bien scientifique que morale. Ingrid Agbato, Valerie Bassien-Capsa, mais aussi mes mies de longue date vivant au quatre coins du monde : Maika Deffieu, Maryvonne Rosamont-Ursulet, Noemie Bueichecku, Nadège Bellance.

Je remercie mes frères et sœur, Sylvain, Arnaud et Régine pour leur soutien morale et leurs attentions. Et bien sûr, je remercie particulièrement mes parents sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, que dire si ce n'est que je leur doit tout.

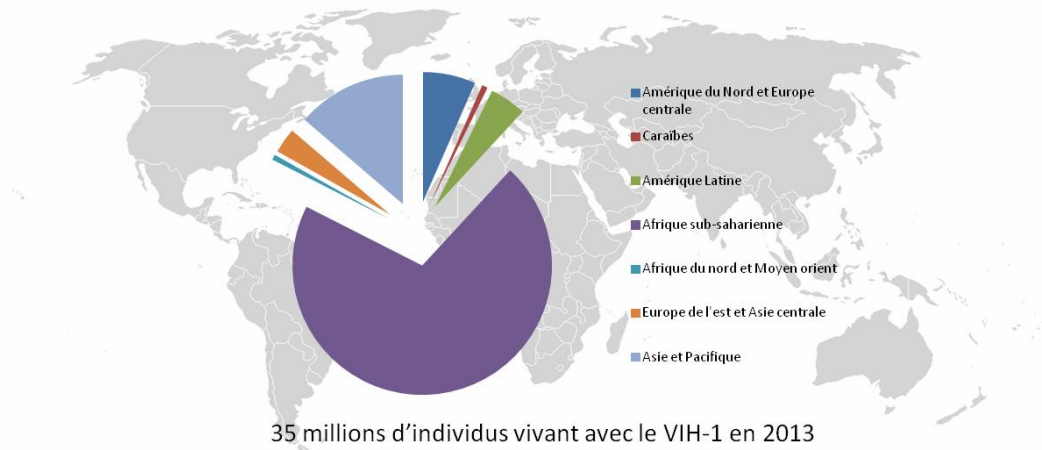
# **INTRODUCTION**

# 1 Épidémiologie et transmission

## 1.1. État de la pandémie

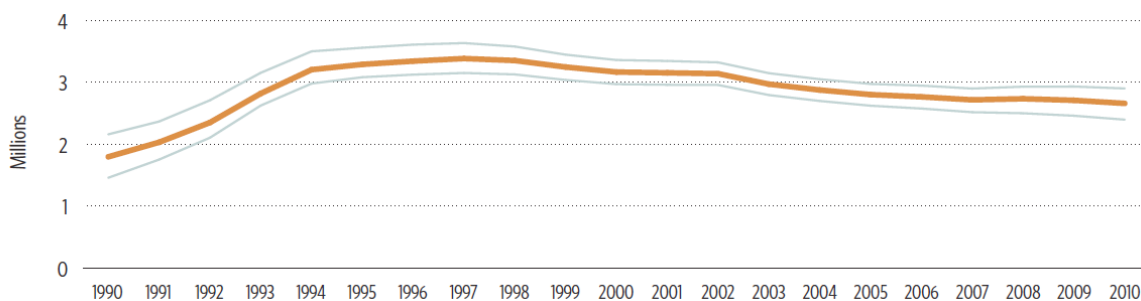
Depuis sa découverte en 1983 (Barre-Sinoussi *et al.* 2004), le VIH, vecteur du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), a infecté plus de 60 millions d'individus et tué plus de 30 millions de personnes (OMS 2011). Après 30 ans de pandémie, aucun vaccin n'est encore disponible et on compte à ce jour 35 millions d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH de par le monde (ONUSIDA 2014). Un des aspects primordiaux de cette épidémie est l'inégalité régionale. En effet, l'Afrique sub-saharienne, qui ne représente que 12% de la population mondiale, héberge 70% (24,7 millions) des individus infectés (Figure 1).

Selon les dernier rapport encourageant des organismes mondiaux OMS, ONUSIDA et Unicef, la progression du virus a ralenti ces dernières années grâce à l'accessibilité aux traitements antirétroviraux, mais aussi aux conseils et dépistage (figure 2) (OMS 2011; ONUSIDA 2014). Cependant, nous sommes encore loin de l'objectif « zéro nouvelles infections, zéro décès», fixé initialement pour 2015 et reporté pour 2030 par ces organismes, avec 2,1 millions de nouvelles infections et 1,5 millions de décès en 2013 ; 73% de ces décès étant comptabilisés en Afrique sub-saharienne (ONUSIDA 2014).



**Figure 1. Prévalence mondiale du VIH-1 en 2013.**

Source (ONUSIDA 2014).



**Figure 2. Nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH-1 de 1990 à 2010.**

Source (OMS 2011).

Au fil des années, l'épidémie qui était au départ à majorité masculine – largement cantonnée à la communauté homosexuelle et aux utilisateurs de drogues injectables – s'est peu à peu féminisée pour devenir aujourd'hui une infection majoritairement féminine. Sur 35 millions d'adultes infectés, 16 millions sont des femmes, représentant 50,3% des adultes vivant avec le VIH-1. Là encore, les inégalités se creusent car c'est en Afrique sub-saharienne et dans les caraïbes que les femmes représentent la grande majorité des individus séropositifs (59% et 53 % respectivement). La plupart des femmes étant en âge de procréer, la transmission mère-enfant (TME) reste la première cause d'infection des enfants de moins de 15 ans.

Avec 3,2 millions de porteurs du VIH-1, les enfants représentent une portion non négligeable des individus infectés. Là encore, l'Afrique sub-saharienne bat tous les records avec 92% des enfants infectés vivant dans cette partie du monde. On dénombre 240 000 nouvelles infections pédiatriques et 190 000 décès d'enfants en 2013 (ONUSIDA 2014). Les femmes enceintes restent une des priorités des organisations mondiales. En 2010, 52% des femmes des régions endémiques n'avaient pas accès aux traitements antirétroviraux à des fins de prévention de la TME (OMS 2011).

## 1.1. Mode de transmission

La transmission du VIH se fait principalement par contact homo- ou hétérosexuel, par injection de sang ou de produits dérivés du sang contaminé, mais également de la mère à l'enfant au cours de la grossesse, pendant l'accouchement ou encore au cours de l'allaitement.

Toutefois, chaque contact n'est pas garant d'une infection, et les risques de transmission varient selon les voies de transmission. En effet, on estime que le contact homosexuel est 10 fois plus à risque que le contact hétérosexuel, avec des fréquences de transmission de 1,7% contre 0,04-0,3% respectivement (Boily *et al.* 2009). De même, il n'y a TME (aussi appelée transmission verticale ou maternofoetale) que dans 25% des cas en absence de traitement (Connor *et al.* 1994).

La TME (Lapointe *et al.* 1985) intervient à tous les stades de la grossesse mais également postpartum via le lait maternel. Dans les pays où l'allaitement artificiel n'est pas disponible, on estime la TME *in utero* avant 36 semaines de gestation à 12%, à 29% la TME après 36 semaines et à 20% la transmission *intrapartum*. Les 39% restants étant transmis *postpartum* via le lait maternel (Kourtis *et al.* 2006).

La TME sera plus amplement discutée à la section 7 de l'introduction.

## **2 Le virus de l'immunodéficience humaine de type-1**

### **2.1. Découverte**

Début 1981, une incidence inhabituelle de pneumonie à *Pneumocystis carinii* (infection fongique pulmonaire) accompagnée du sarcome de Kaposi (rare cancer de la peau) habituellement observé chez les personnes immunodéprimées, est rapportée par des médecins de Californie et de New-York chez des hommes homosexuels (Gottlieb *et al.* 1981; Siegal *et al.* 1981). Ces cas étaient souvent accompagnés d'autres maladies opportunistes rares. Il fut alors établi que ces personnes souffraient d'une immunodéficience résultant de la diminution significative de leur nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LTCD4<sup>+</sup>) (Gottlieb *et al.* 1981; Masur *et al.* 1981). La maladie fut alors associée à la communauté homosexuelle, et divers noms lui étaient attribués tels que « gay compromise syndrome » (Brennan and Durack 1981). Mais la même année, et en 1982, des cas furent découverts chez les utilisateurs de drogues injectables, incluant des femmes (Masur *et al.* 1982; Stoneburner *et al.* 1988), les hémophiles (Stehr-Green *et al.* 1988), des personnes transplantées (Atkinson *et al.* 1987; Dummer *et al.* 1989), et des immigrants haïtiens (CDC 1982b). Les premiers cas de possible TME furent également

rapportés (CDC 1982c). Il fut alors évident que la maladie n'était pas cantonnée à la communauté homosexuelle américaine, d'autant plus que des cas similaires étaient rapportés en Europe (Rozenbaum *et al.* 1982; Vilaseca *et al.* 1982). La mise en évidence de ces nouveaux cas a permis de conclure à la transmission par voie sanguine et sexuelle d'un virus.

En septembre 1982, l'acronyme SIDA, pour syndrome d'immunodéficience acquise, fut choisi pour cette maladie aux multiples manifestations (CDC 1982a; Quagliarello 1982).

Le HTLV-I (human T-cell lymphotropic virus I) étant un rétrovirus lymphotrope dont la pathogenèse ressemblait à celle du virus du SIDA, les recherches se dirigèrent vers le HTLV-I. C'est ainsi qu'en 1983, l'équipe du Dr. Montagnier à l'Institut Pasteur, à partir d'échantillons de ganglions lymphatiques d'un patient atteint de lymphadénopathie (identifiée comme une maladie opportuniste du stade pré-SIDA), a pu isoler et décrire un rétrovirus associé au SIDA du même type que le HTLV mais totalement distinct, virus qu'ils nommèrent LAV pour lymphadenopathy-associated virus (Barre-Sinoussi *et al.* 1983). C'est Robert Gallo qui, un an plus tard, établit un lien direct, à partir d'échantillons reçus de l'Institut Pasteur, entre le LAV, qu'il appelle alors le HTLV-III (human T-cell lymphotropic virus III), et le SIDA (Popovic *et al.* 1984). La même année, une équipe de San-Francisco, de façon indépendante, décrit elle aussi le même virus qu'elle appelle ARV pour AIDS-associated retroviruses (Levy *et al.* 1984). Le séquençage complet du LAV en 1985 permet de conclure que les trois virus sont en fait le même pathogène (Wain-Hobson *et al.* 1985).

En 1986, à partir d'échantillons d'un patient d'Afrique de l'ouest, l'équipe du Dr. Montagnier identifie un 2<sup>ème</sup> type de LAV qu'il nomme le LAV-2 (Clavel *et al.* 1986). La même année, le terme de VIH (virus de l'immunodéficience humaine) est adopté donnant lieu au VIH-1 et VIH-2 (Coffin *et al.* 1986).

## **2.2. Origine**

Ce n'est que bien plus tard que l'on su que le VIH-1 trouvait son origine chez le singe, résultant d'une transmission et d'une adaptation à l'homme du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (Sharp and Hahn 2010). Toutefois, le VIH-1 ne correspond pas à un seul virus. Il en existe 4 grands groupes distincts appelés M (major), O (outlier), N (non-M, non-O) et P

issus chacun de 4 événements indépendants de transmission à l'homme. Le groupe M, à l'origine de la pandémie, fut le premier à être découvert en 1981. Le groupe O, découvert en 1990 (De Leys *et al.* 1990) est beaucoup moins prévalent que le précédent avec quelques dizaines de milliers de cas répertoriés en Afrique centrale. Le groupe N, identifié en 1998 (Simon *et al.* 1998) dont seul une dizaine de cas sont connus, sévit au Cameroun. Enfin, le groupe P, récemment identifié, n'a pour l'instant été isolé que chez 2 individus originaires également du Cameroun (Plantier *et al.* 2009).

Les analyses phylogénétiques ont permis de déterminer, pour chacun de ces groupes, l'origine animale ainsi que la date approximative du passage à l'homme. Les groupes M et N sont tous deux issus du SIV du chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* (SIVcpzPtt) (Gao *et al.* 1999) tandis que les groupes O et P sont eux issus du SIV de gorille (SIVgor) (Neel *et al.* 2010). Les événements de transmission pour les trois premiers groupes ont eut lieu au début du XX<sup>e</sup> siècle. Concernant le groupe P date reste inconnue, les 2 uniques séquences isolées ne permettant pas de faire des analyses phylogénétiques poussées aboutissant à la détermination de l'ancêtre commun le plus récent.

Le VIH-2 quant à lui est issu du SIV du mangabey cendré, probablement transmis à l'homme au début du 20<sup>e</sup> siècle, sévit en Afrique de l'ouest (Wertheim and Worobey 2009).

Le bassin d'émergence du VIH-1 est la République démocratique du Congo (RDC), où le plus vieil échantillon, datant de 1959, a été retrouvé (Zhu *et al.* 1998). On y trouve également représentés tous les sous-types existant dans le monde (Figure 9) (Hemelaar 2012). Les conditions ayant permis la dissémination globale du VIH-1 ne sont pas connues, mais plusieurs hypothèses ont été avancées concernant le virus du groupe M. L'hypothèse privilégiée place l'origine de la pandémie en RDC (plus précisément à Kinshasa) sous le roi Léopold II de Belgique au début des années 1920, période noire de la Belgique coloniale associée à la déstabilisation de la société, à la promiscuité sexuelle, et aux campagnes de vaccination massives (sans méthodes de stérilisation adéquate). Ces conditions auraient permis au virus, après un passage du singe au chasseur, de s'adapter à l'homme (Chitnis *et al.* 2000; Pepin 2011; Tebit and Arts 2011).



## 2.3. Virologie

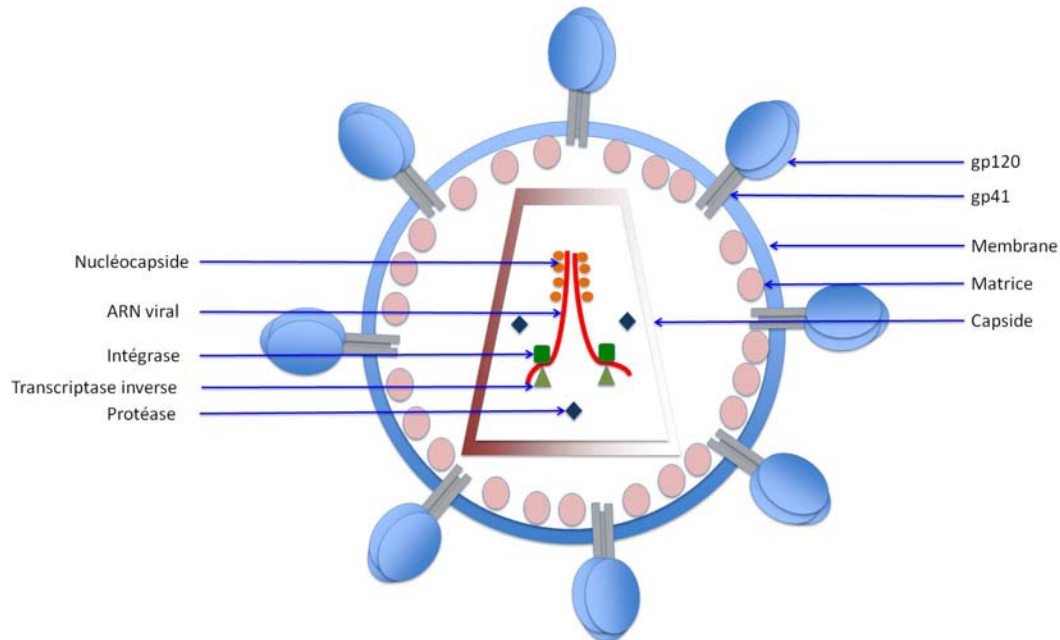
Le VIH est un rétrovirus de la famille des Retroviridae et du genre lentivirus. Les lentivirus causent des infections chroniques à longue période de latence clinique, une réplication virale persistante, et l'atteinte du système nerveux central. On compte parmi les lentivirus, le visna du mouton, le virus de l'immunodéficience féline (FIV) ainsi que le SIV.

### 2.3.1. Architecture de la particule virale

Le VIH-1, comme tous les lentivirus, est un virus enveloppé dont la particule virale mesure 100 nm de diamètre. Son génome est constitué de 2 copies d'un ARN simple brin sens de 10 Kb codant pour les 9 gènes viraux. Cet ARN est associé à la transcriptase inverse (p51) ainsi qu'à la protéase (p11) et l'intégrase virale (p31).

L'enveloppe du virion, un complexe lipoprotéique, est composée d'une dizaine de protéines d'enveloppe virale trimériques (Env) encrées dans une bicouche lipidique issue de la cellule hôte, et contient également des protéines membranaires cellulaires (Arthur *et al.* 1992; Ott 2008; Zhu *et al.* 2006). Ces protéines cellulaires qui peuvent être des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), des molécules d'actine ou encore d'ubiquitine (Arthur *et al.* 1992), mais aussi des intégrines telles que ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) qui vont potentialiser l'attachement du virus sur la cellule cible exprimant le ligand LFA-1 (Fortin *et al.* 1999; Paquette *et al.* 1998). Les glycoprotéines d'enveloppe forment des spicules ou « spikes » (protubérances) à la surface de la particule virale. Il s'agit d'hétérodimères formés de la gp120 (sous-unité de surface) et de la gp41 (sous-unité transmembranaire) arrangés en trimères. Sous l'enveloppe lipidique, on retrouve la matrice composée de 2000 copies de protéine de matrice (MA, p17). Au centre de la particule virale, la capsid conique caractéristique du VIH, composée de 2000 copies de protéine de capsid (CA, p24), renferme le génome du virus. Le génome viral, composé de 2 copies de l'ARN simple brin sens est complexé à la nucléocapsid (NC, p7) formant ainsi un complexe ribonucléoprotéique. Associé au génome on retrouve également 3 enzymes virales essentielles : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT, reverse transcriptase) et l'intégrase (IN). Le virion encapsid

également les protéines accessoires, Nef, Vif, et Vpr. Trois autres protéines virales Rev, Tat et Vpu, n'apparaissent pas dans la particule virale (Turner and Summers 1999) (Figure 3).



**Figure 3. Structure de la particule virale du VIH-1.**

### 2.3.2. Organisation génomique et fonction des gènes

Le génome du VIH-1, ARN de 10kb, contient 9 gènes codant pour 15 protéines (Frankel and Young 1998). C'est par un habile jeu de décalages de cadre de lecture, d'épissages alternatifs et de production de polyprotéines que le virus atteint cette densité de gènes dans un seul ARN. La structure classique de tout génome rétroviral est la suivante : 5' LTR-gag-pol-env-LTR 3'. Les régions LTR (long terminal repeat), qui ne codent pour aucune protéine, représentent les 2 extrémités du génome qui seront connectées à l'ADN cellulaire lors de l'intégration et contiennent le promoteur viral. *gag* (group specific antigen) code pour les protéines structurales de la matrice, de la capside et de la nucléocapside. Gag est produit en tant que précurseur p55 qui sera clivé par la protéase virale en p17, p24, p7 et p6. *pol* (polymérase) code pour les enzymes virales : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Ces enzymes sont produites en tant que précurseur polyprotéique Gag-Pol qui sera clivé par la protéase

virale. *env* code pour l'enveloppe produite en tant que gp160 qui sera clivée en gp41 et gp120 par des protéases cellulaires.

En plus de ces gènes communs à tous les rétrovirus, le VIH-1 produit 6 protéines additionnelles qui sont Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr et Vpu. Alors que Tat et Rev, protéines régulatrices, sont requises pour la réplication virale, Nef, Vif, Vpr et Vpu sont habituellement facultatives dans plusieurs systèmes *in vitro* et sont donc appelés protéines accessoires. Toutefois, ces protéines sont nécessaires pour la réplication virale et la pathogenèse *in vivo* (Li *et al.* 2005) (Figure 4).

La protéine Tat, transactivateur de la transcription, active l'initiation de la transcription et l'élongation en se liant à l'élément TAR de l'ARN messenger viral (Ruben *et al.* 1989).

Rev, deuxième protéine régulatrice essentielle, lie le RRE (Rev responsive element) et permet l'export nucléaire, la stabilisation et l'utilisation des ARNm viraux partiellement ou non épissés, permettant ainsi la transition entre l'expression des gènes de la phase précoce et celle des gènes de la phase tardive (Kim *et al.* 1989; Malim *et al.* 1989; Zapp and Green 1989).

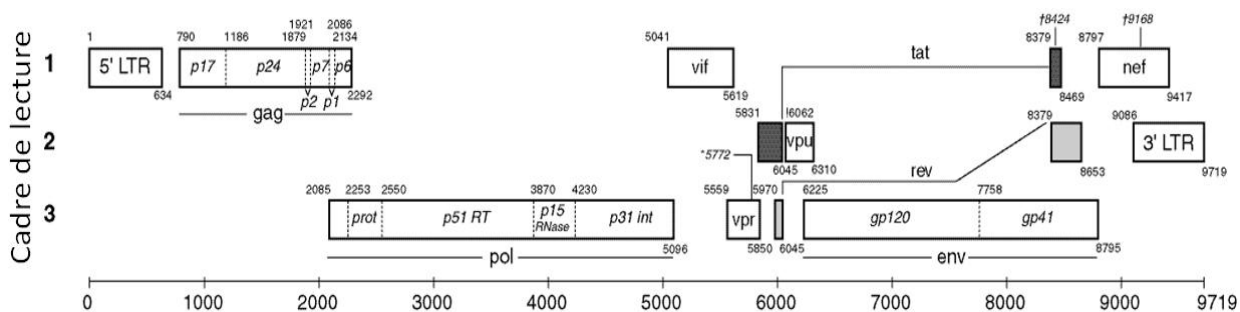
Nef est une protéine multifonctionnelle très importante dans la pathogenèse du virus. En effet, son absence ralentit ou abolit complètement la progression de la maladie vers le stade SIDA (Kestler *et al.* 1991). Nef régule négativement l'expression à la surface des cellules infectées du récepteur, CD4, mais aussi des corécepteurs CCR5 et CXCR4 afin de prévenir la surinfection (Aiken *et al.* 1994; Garcia and Miller 1992; Landi *et al.* 2011) (voir section 4). De plus, Nef entraîne également la diminution de l'expression des molécules du CMH-I et du CMH-II, facilitant ainsi l'évasion immunitaire (Chaudhry *et al.* 2009; Schwartz *et al.* 1996). Finalement, Nef interfère avec la transduction provenant du signal des récepteurs T et augmente l'infectivité du virus (Luria *et al.* 1991; Miller *et al.* 1994).

Vif (viral infectivity factor) est essentielle à la réplication virale dans les lymphocytes et les macrophages du sang périphérique et certaines lignées cellulaires (Strebel *et al.* 1987). En effet, Vif interagit avec et provoque la dégradation par le protéasome d'une cytidine

désaminase de la cellule hôte, APOBEC3G (Yu *et al.* 2003). APOBEC3G qui, en absence de Vif, inhibe efficacement la réplication du VIH-1 (Sheehy *et al.* 2002).

La protéine Vpr (viral protein R) a elle aussi plusieurs rôles. Vpr induit à la fois l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et l'apoptose via l'interaction avec plusieurs facteurs cellulaires (Andersen and Planelles 2005; He *et al.* 1995; Jowett *et al.* 1995; Re *et al.* 1995; Rogel *et al.* 1995). Vpr intervient également dans l'import nucléaire du complexe de préintégration (PIC) dans les cellules qui ne sont pas en division (Le Rouzic *et al.* 2002).

Vpu (viral protein U), protéine membranaire intégrale, permet la dégradation de molécules de surface telle que CD4 par le protéasome (Willey *et al.* 1992). Il a également été démontré en 2008 que Vpu régule négativement l'expression d'un facteur de restriction du VIH-1, tetherin/BST2 à la surface cellulaire, permettant ainsi un bourgeonnement plus efficace des particules virales (Neil *et al.* 2008).



**Figure 4. Organisation du génome du VIH-1.**

Source (hiv.lanl.gov).

### 2.3.3. Le cycle de réplication

Le cycle de réplication du VIH-1 se fait en 2 étapes : La phase précoce, qui s'étend de la reconnaissance de la cellule cible à l'intégration du génome viral au génome de la cellule hôte, et la phase tardive, débutant par la régulation de l'expression du génome proviral et se terminant par le bourgeonnement et la maturation du virion (Figure 5).

- **Phase précoce**

La phase précoce débute par la reconnaissance et la liaison de la gp120 virale à la molécule CD4, récepteur du VIH-1 à la surface de la cellule cible (Dalgleish *et al.* 1984; Maddon *et al.* 1986). L'attachement à CD4 ne suffit pas à l'entrée virale qui nécessite l'interaction de l'enveloppe avec un corécepteur d'entrée, CCR5 ou CXCR4 (Dragic *et al.* 1996; Feng *et al.* 1996). Il s'ensuit alors la fusion membranaire initiée par la gp41 qui s'insère dans la membrane de la cellule hôte et rapproche les membranes virale et cellulaire jusqu'à la fusion des couches lipidiques. La capsid virale est alors libérée dans le cytoplasme et, par un processus encore mal connu, il y a décapsidation qui donne lieu à un complexe de pré-intégration (PIC) au sein duquel a lieu la transcription inverse. Le PIC est constitué, après décapsidation complète, de la nucléocapside, de Vpr, de l'intégrase, de quelques protéines de matrice et de l'ADNc (Miller *et al.* 1997; Nermut and Fassati 2003). Le PIC est alors transporté du cytoplasme vers l'intérieur du noyau à travers des pores nucléaires, Vpr jouerait un rôle dans le transport du PIC au noyau (Yao *et al.* 1995).

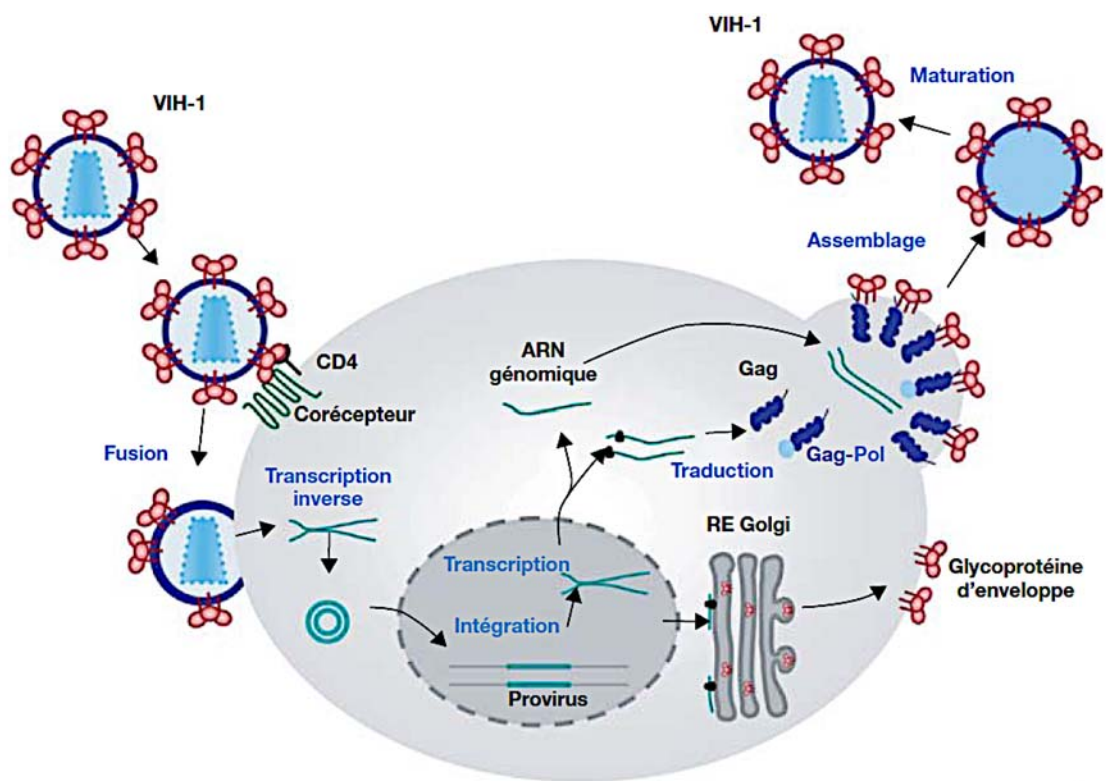
Après le transport actif au noyau, le progénome viral est intégré de façon covalente au génome de la cellule hôte grâce à l'activité catalytique de l'intégrase, et devient un provirus (Zheng *et al.* 2005).

- **Phase tardive**

Cette phase débute par la synthèse d'une trentaine de transcrits épissés et non épissés qui sont transportés hors du noyau pour traduction (Purcell and Martin 1993). Dans un premier temps, il y a production des protéines Rev, Tat et Nef à partir de petits ARNm complètement épissés. Puis l'accumulation de Rev permet le transport hors du noyau de transcrits non épissés correspondant au génome viral et aux ARNm codant pour les précurseurs polyprotéiques Gag (p55) et Gag-Pol. Également transportés tardivement grâce à Rev sont les ARNm partiellement épissés codant pour Env, Vif, Vpr et Vpu (Karn and Stoltzfus 2012). Après traduction des protéines, l'assemblage de la particule virale est initié par p55 qui se multimérise et est capable de s'associer à la membrane plasmique, à l'ARN génomique et à la queue cytoplasmique de la gp41. Ces propriétés de Gag permettent le recrutement des

composant du virion au site d'assemblage que sont des radeaux lipidiques de la membrane plasmique (Hogue *et al.* 2011).

S'ensuivent le bourgeonnement et le relargage des particules virales. La maturation du virion intervient immédiatement après ou pendant de bourgeonnement, et consiste en le clivage des précurseurs p55 et Gag-Pol pour donner des protéines matures. Cette maturation se traduit par un réarrangement du cœur du virus, qui passe d'une forme sphérique à cette forme conique caractéristique du VIH-1 (Briggs and Krausslich 2011; Krausslich 1991).



**Figure 5. Cycle réplcatif du VIH-1.**

Source (Baudy *et al.* 2008).

## 2.4. La pathogenèse du VIH-1

Le mécanisme central par lequel de VIH-1 induit l'immunodéficience est la déplétion du nombre de LTCD4<sup>+</sup> ou T auxiliaires (Th pour T helper), chefs d'orchestre de la réponse immunitaire. Comme tous les lentivirus, l'infection à VIH est une maladie à évolution lente et chronique. La pathogenèse du VIH-1 se déroule en 3 phases (Figure 6).

### 2.4.1. La primo-infection ou phase aigüe

Une fois que le virus a pénétré l'organisme, il se multiplie en grand nombre dans les cellules cibles, majoritairement les cellules T CD4<sup>+</sup> et se propage à tout l'organisme où il colonise tous les organes lymphoïdes, mis à part le système nerveux central. Cette phase aigüe, qui s'étale sur plusieurs semaines, est caractérisée par une charge virale plasmatique très élevée, une expansion des cellules TCD8<sup>+</sup> et une diminution drastique du taux de LTCD4<sup>+</sup> (Cummins and Badley 2010; Fauci *et al.* 1996) (Figure 7). Les LTCD4 des tissus lymphoïde associés au tube digestif (GALT : Gut associated lymphoid tissue) sont la première ligne de déclin des cellules CD4 car elles représentent le plus grand réservoir de cellules cibles du VIH-1; *i.e.* les cellules T CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> (Chun *et al.* 2008). Ce réservoir ne se reconstituera plus à des niveaux normaux tout au long de la maladie, une des caractéristiques principales de l'infection à VIH-1. La fin de cette phase est marquée par la diminution de la charge virale jusqu'à un niveau appelé « viral set point », variant d'un individu à l'autre, qui restera la même tout au long de la phase chronique. La réduction de la charge virale est due à l'établissement des réponses VIH-spécifiques à médiation cellulaire (Koup *et al.* 1994; Safrit *et al.* 1994).

### 2.4.2. La phase chronique

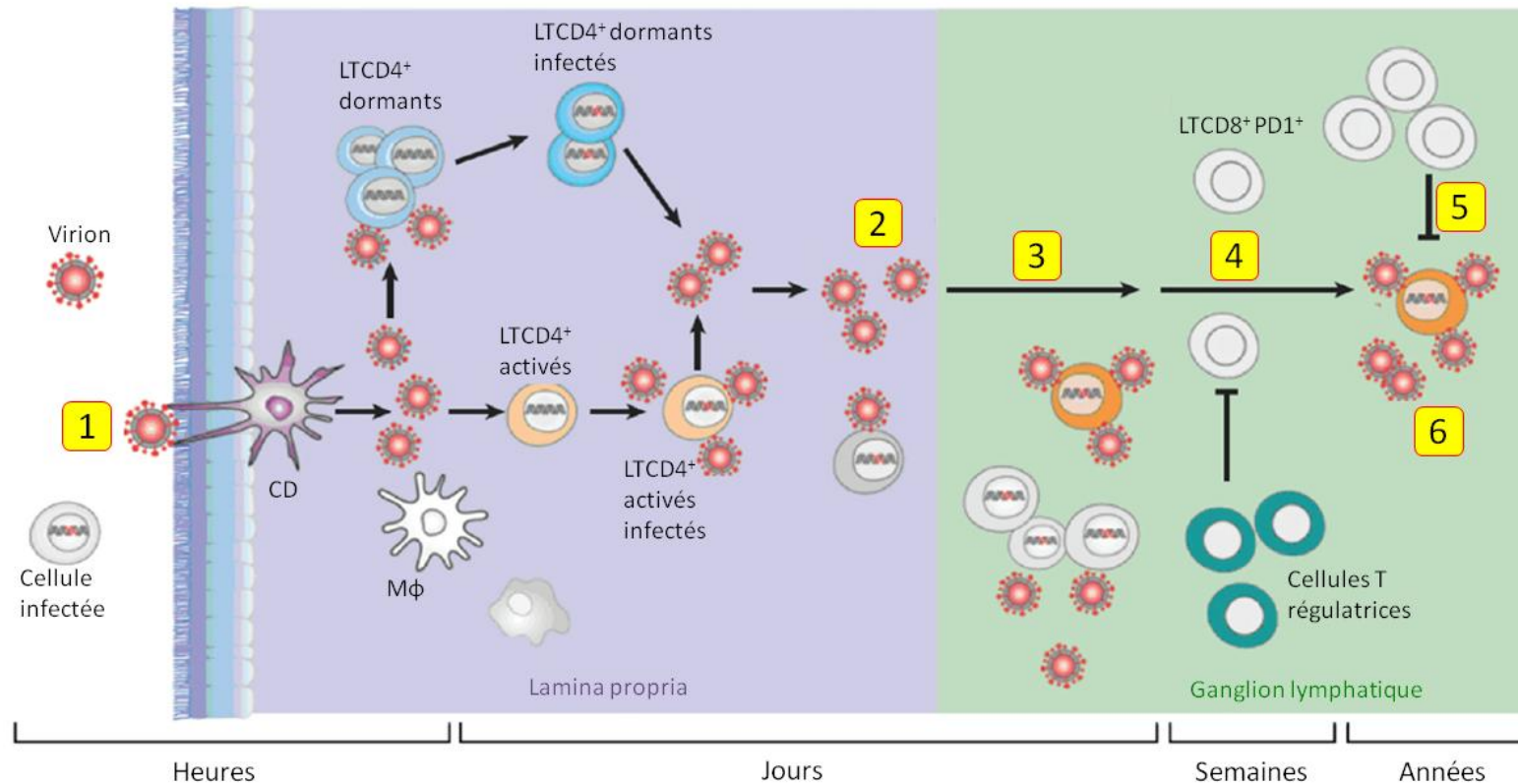
Cette phase est la plus longue des trois et se déroule sur plusieurs années allant d'une décennie (dans 70% des cas) à plusieurs décennies selon les individus (Figure 7), les classant en plusieurs groupes selon la rapidité d'évolution de la maladie : les non-progresseurs à long terme, les progresseurs lents et les progresseurs rapides (Baker *et al.* 2009; Hay *et al.* 1999; Zaunders and van Bockel 2013). Durant cette phase, les réponses cellulaires et humorales arrivent à maintenir la réplication virale à bas bruit. Là encore la charge virale de maintien

distingue les groupes d'individus. Le virus, constamment soumis à la pression immunitaire, va sans cesse évoluer afin d'échapper à cette réponse immunitaire spécifique (Haas *et al.* 2011).

### **2.4.3. Le stade SIDA**

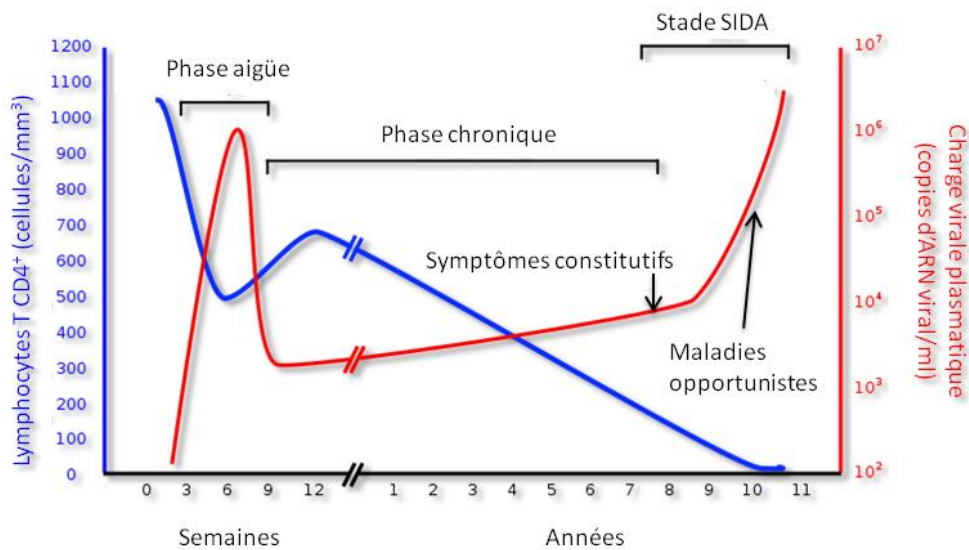
Le système immunitaire qui aura été soumis à une constante activation par la réplication virale va ultimement s'épuiser, ce qui mène au stade SIDA. En effet, durant la phase chronique les cellules CD4 sont perdues à un rythme plus rapide que le renouvellement naturel (turn-over). On arrive finalement à une déplétion critique des LTCD4 pour arriver à des taux inférieurs à 200 cellules par mm<sup>3</sup> de sang, ce qui correspond au stade SIDA (Alimonti *et al.* 2003). La réponse immunitaire est considérablement affaiblie, voir inexistante, le virus peut alors allègrement se multiplier et prendre le dessus. La charge virale atteint des niveaux très élevés. À ce stade, les infections opportunistes apparaissent (*Candida albicans*, *Pneumocystis viroveci*) et entraînent la mort du sujet (Figure 7).





**Figure 6. La pathogenèse du VIH-1 : Étapes de l'infection suite à l'exposition au virus.**

**1)** Traversée de la barrière muqueuse par les virions libres, les cellules infectées ou les virions attachés aux cellules dendritiques (CD). **2)** Propagation massive du virus dans les LTCD4<sup>+</sup> activés de la lamina propria du tissu lymphoïde associé au tube digestif. **3)** Dissémination aux tissus lymphoïdes secondaires et établissement de réservoirs tissulaires stables. **4)** Activation immunitaire chronique conduisant à « l'hexaustion » immunitaire (expression de PD1 sur les LTC8<sup>+</sup>). **5)** Il en résulte un contrôle immunitaire partiel du virus et **6)** une production virale soutenue. PD1, programmed death 1; Mφ, macrophage. Adapté de (Mirza and Rathore 2012).



**Figure 7. Évolution de la maladie.**

Source (Fauci *et al.* 1996).

### 3 La thérapie antirétrovirale

#### 3.1. Mécanisme d'action des antirétroviraux

Toutes les étapes du cycle de réplication du VIH-1 sont des cibles potentielles des agents antirétroviraux (ARV) destinés à ralentir la réplication virale. Les ARV disponibles permettent de bloquer quatre étapes cruciales du cycle du virus qui sont l'entrée virale, la transcription inverse du génome viral, l'intégration, et la maturation des protéines (Figure 8).

À l'heure actuelle, 27 ARV sont approuvés par l'Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA : *US Food and Drug Administration*) pour le traitement de l'infection à VIH-1 et plusieurs sont encore en cours de développement. Ces ARV sont classés en 6 catégories selon leur mécanisme d'action. On retrouve les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non-nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INNTI), les inhibiteurs de protéase

(IP), les inhibiteurs de fusion (IF), les inhibiteurs d'entrée (IE) et les inhibiteurs d'intégrase (II) (Figure 8) (FDA 2013).

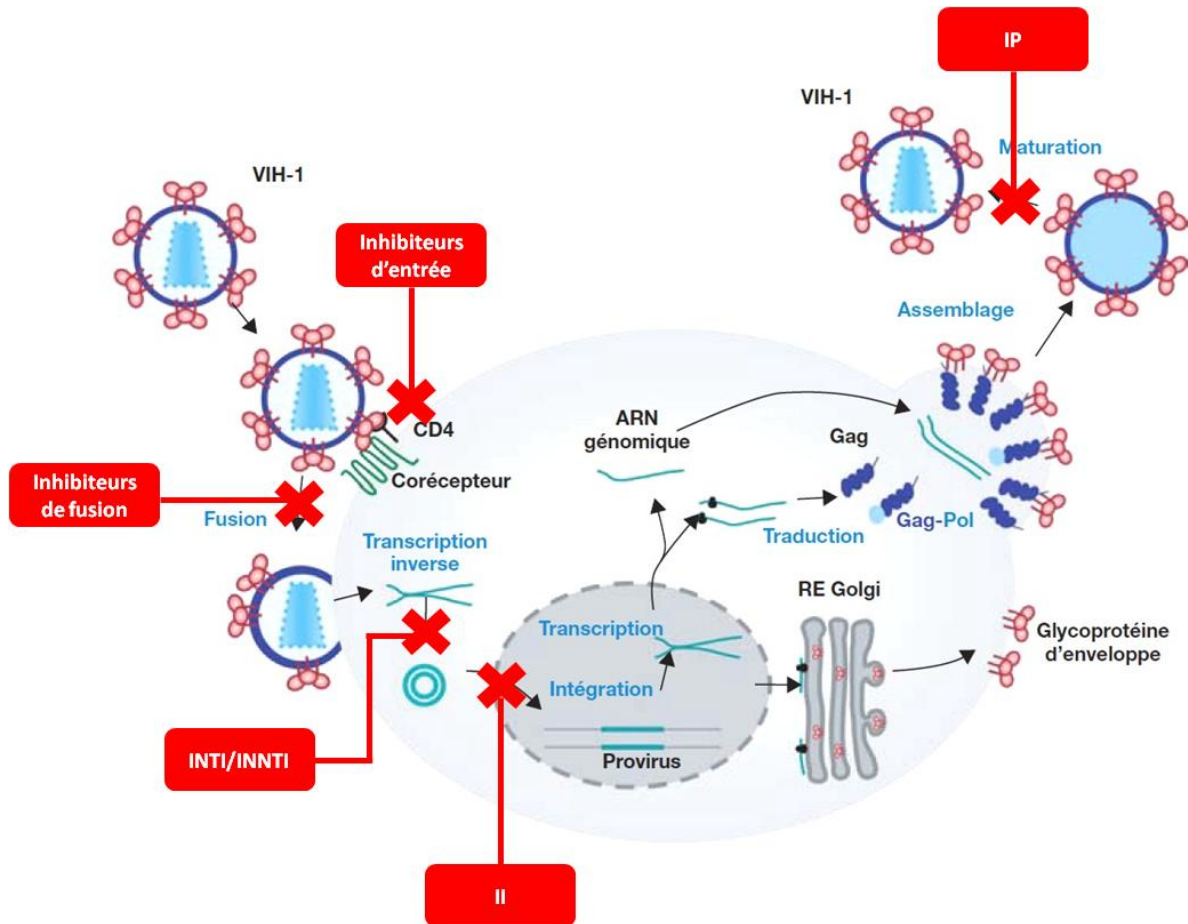


Figure 8. Mode d'action des différents agents ARV dans le cycle du VIH-1.

Adapté de (Baudy *et al.* 2008).

### 3.2. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse comprennent deux classes d'agents, les INTI et les INNTI.

Les INTI furent les premiers ARV approuvés par la FDA pour le traitement de l'infection à VIH-1. Les INTI agissent en tant que substrats alternatifs, ils entrent en compétition avec les nucléosides physiologiques et agissent en tant que terminateurs de chaîne. Ils diffèrent des

nucléosides par absence du groupement 3'-hydroxyl, ce qui aboutit à l'arrêt de la transcription inverse suite à leur incorporation à la chaîne d'ADN en cours de synthèse (Cihlar and Ray 2010).

Contrairement aux analogues nucléosidiques les INNTI se fixent directement et de façon non compétitive à proximité du site catalytique de la transcriptase inverse. Ceci résulte en un changement conformationnel de l'enzyme qui réduit fortement son activité catalytique de polymérisation (de Bethune 2010).

**Tableau 1. Liste des inhibiteurs la transcriptase inverse par ordre d'approbation par la FDA (FDA 2013).**

| Classe | Agents        | Abréviation | Nom commercial | Année d'approbation par la FDA |
|--------|---------------|-------------|----------------|--------------------------------|
| INTI   | Zidovudine    | AZT (ZDV)   | Ratovir        | 1987                           |
|        | Didanosine    | ddI         | Videx          | 1991                           |
|        | Zalcitabine   | ddC         | Hivid          | 1992                           |
|        | Stavudine     | d4T         | Zerit          | 1994                           |
|        | Lamivudine    | 3TC         | Epivir         | 1995                           |
|        | Abacavir      | ABC         | Ziagen         | 1998                           |
|        | Tenofovir*    | TDF         | Viread         | 2001                           |
|        | Emtricitabine | FTC         | Emtriva        | 2003                           |
| INNTI  | Nevirapine    | NVP         | Viramune       | 1996                           |
|        | Delavirdine   | DLV         | Rescriptor     | 1997                           |
|        | Efavirenz     | EFV         | Sustiva        | 1998                           |
|        | Etravirine    | ETR         | Intelence      | 2008                           |
|        | Rilpivirine   | RPV         | Edurant        | 2011                           |

\*Le Tenofovir est le seul analogue nucléotidique, tous les autres INTI sont des analogues nucléosidiques.

### 3.3. Les inhibiteurs de la protéase

Les IP sont des composés qui se lient de façon très spécifique et avec une forte affinité au site actif de la protéase virale. Ils inhibent l'activité enzymatique et bloquent la production de virus infectieux par l'inhibition du clivage du précurseur polyprotéique Gag-Pol. Ceci résulte en la production de particules virales immatures non-infectieuses (Ammaranond and Sanguansittianan 2012).

**Tableau 2. Les inhibiteurs de protéase par ordre d'approbation par la FDA (FDA 2013)**

| Classe | Agents              | Abréviation | Nom commercial      | Année d'approbation par la FDA |
|--------|---------------------|-------------|---------------------|--------------------------------|
| IP     | Indinavir           | IDV         | Crixivan            | 1996                           |
|        | Ritonavir           | RTV         | Norvir              | 1996                           |
|        | Nelfinavir          | NFV         | Viracept            | 1997                           |
|        | Saquinavir*         | SQV         | Invirase, Fortovase | 1997                           |
|        | Amprenavir          | APV         | Agenerase           | 1999                           |
|        | Lopinavir/ritonavir | LPV/r       | Kaletra             | 2000                           |
|        | Atazanavir          | ATV         | Reyataz             | 2003                           |
|        | Fosamprenavir       | FPV         | Lexiva              | 2003                           |
|        | Tiprenavir          | TPV         | Aptivus             | 2005                           |
|        | Darunavir           | DRV         | Prezista            | 2006                           |

\*le Saquinavir n'est plus en vente.

### 3.4. Les inhibiteurs d'entrée

Les inhibiteurs d'entrée peuvent cibler les 3 étapes dans l'entrée virale qui sont (1) la liaison au récepteur CD4 cellulaire; (2) la liaison au corécepteur; et (3) la fusion des membranes. Pour l'instant seuls deux d'entre eux sont approuvés par la FDA et d'autres sont en cours d'étude. (Voir section 5 « La glycoprotéine de l'enveloppe et l'entrée virale »)

**Tableau 3 Les inhibiteurs d'entrée par ordre d'approbation par la FDA (FDA 2013)**

| Classe               | Agents      | Abréviation | Nom commercial | Année d'approbation par la FDA |
|----------------------|-------------|-------------|----------------|--------------------------------|
| Inhibiteur de fusion | Enfivirtide | T20         | Fuzeon         | 2003                           |
| Antagoniste de CCR5  | Maraviroc   | MVC         | Selzentry      | 2007                           |

### 3.5. Inhibiteurs de l'intégrase

Les inhibiteurs de l'intégrase (II) sont la classe la plus récente d'antirétroviraux utilisés dans le traitement du VIH-1. Tous les II interfèrent avec l'étape de transfert de brin dans l'intégration de l'ADN proviral nouvellement synthétisé. Ils se lient au site catalytique et inhibent le transfert de brin (Karmon and Markowitz 2013).

**Tableau 4. Les inhibiteurs de l'intégrase par ordre d'approbation par la FDA (FDA 2013)**

| Classe                          | Agent         | Abréviation | Nom commercial | Année d'approbation par la FDA |
|---------------------------------|---------------|-------------|----------------|--------------------------------|
| Inhibiteur du transfert de brin | Raltegravir   | RTV         | Isentress      | 2007                           |
|                                 | Elvitegravir* | GS-9137     | Stribild       | 2012                           |

\*Elvitegravir est utilisé uniquement dans le cadre du médicament combiné Stribild (Elvitegravir/GS-9350/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate).

### **3.6. La thérapie antirétrovirale combinée (cART)**

La monothérapie était utilisée dès la découverte des premiers agents, à commencer par l'AZT en 1987. Malheureusement, la monothérapie aux INTI qui dura jusqu'en 1995, s'avéra peu efficace, les patients développant des résistances. À partir de 1996, les choses s'accélérent avec d'abord la découverte que la bithérapie est plus efficace que la monothérapie (Hammer *et al.* 1996). La découverte des inhibiteurs de protéase (Cameron *et al.* 1998) suivie immédiatement par celle des INNTI, a ensuite propulsée le traitement vers à la thérapie antirétrovirale combinée (cART pour *combination antiretroviral therapy*). La cART est en général composé de deux INTI, et d'un INNTI ou un PI, et est maintenant le traitement standard proposé aux patients infectés par le VIH-1 (Thompson *et al.* 2010).

Grace à l'introduction de la cART, le nombre de cas de SIDA a drastiquement diminué, entre 1994 et 1998 le taux de SIDA en Europe a chuté de 30,7% à 2,5% et les maladies opportunistes devinrent une occurrence rare (Palella *et al.* 1998; Palella Jr *et al.* 2002).

La cART a en effet diminué la morbidité et la mortalité liée au SIDA, allongeant considérablement la durée de vie des individus infectés, transformant la maladie en une maladie chronique (Ammassari *et al.* 2012; Palella *et al.* 1998).

Toutefois, la prise d'ARV n'éliminant pas le virus, les traitements sont pour la vie, ce qui peut réduire l'adhérence des patients. L'adhérence est un facteur crucial dans le succès du traitement ARV. En effet, la non-adhérence peut engendrer l'échec du traitement et l'apparition de résistances (Cadosch *et al.* 2012). Ce qui diminue la fourchette d'ARV disponibles aux patients.

## **4 Diversité génétique du VIH-1**

Le VIH-1 est caractérisé par une très grande diversité génétique intra et inter-hôte. Cette diversité reste un obstacle majeur à la vaccination.

En effet, à l'intérieur d'un même individu, le VIH-1 existe en tant que population de variants génétiquement proches mais distincts appelée « quasiespèce », chaque variante portant des mutations aléatoires uniques pouvant être délétères, neutres ou bénéfiques dépendamment de

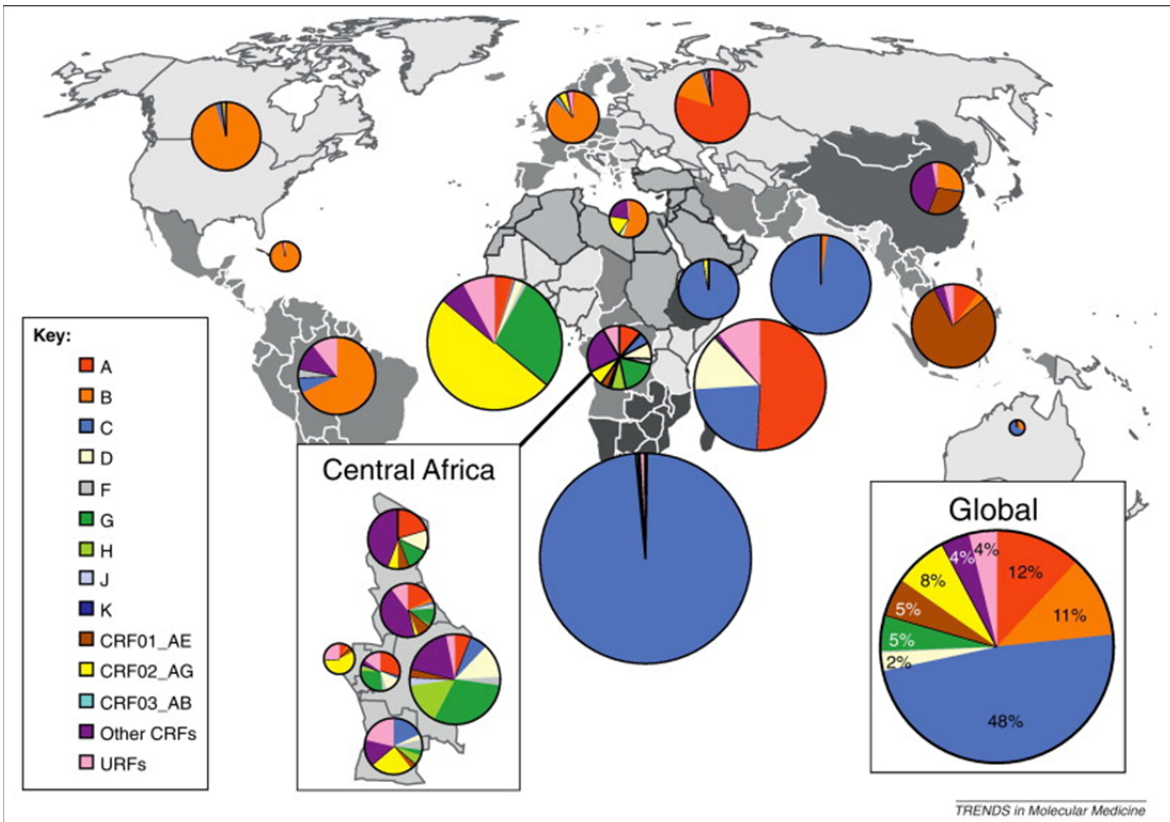
l'environnement dans lequel le virus évolue. La variation nucléotidique ou variation génétique retrouvée dans une quasispèce peut atteindre 10% (Korber *et al.* 2001).

Au cours de la progression de l'épidémie, cette grande diversité génétique intra-hôte a conduit à une diversité inter-hôte et aussi inter-populations, menant à l'apparition des différents sous-types (ou clades) du VIH-1. Le groupe M, à l'origine de la pandémie, a été subdivisé en 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, et K) dont certains comprennent même des sous-clades (A1 à A4 ; F1 et F2). En termes de substitutions nucléotidiques, la variation génétique à l'intérieur d'un même sous-type est de 15-17% et peut aller jusqu'à 30% selon les clades, tandis que la variation inter-sous-types est de l'ordre de 17-35% (Hemelaar 2012). La diversité intra-clade continue d'augmenter avec le temps (Rambaut *et al.* 2001). En effet, les grappes de population au niveau régional ont donné naissance à des sous-types qui sont caractéristique de certaines régions du globe. Par exemple, le sous-type C, le plus prédominant de par le monde (48% des infections), est endémique en Afrique subsaharienne. Le sous-type B, deuxième sous-type en terme de prévalence (12% des infections) est caractéristique de l'Amérique du nord, d'Haïti, et de l'Europe (Hemelaar 2012) (Figure 9).

Les dernières décennies ont également vu l'apparition de formes recombinantes circulantes (CRF ; *circulating recombinant form*) ou uniques (URF ; *unique recombinant form*). Elles sont le résultat de recombinaisons entre 2 sous-types lors de la coïnfection d'un individu par 2 souches différentes. Le recombinant est classifié en temps que CRF s'il est retrouvé chez plus de 2 personnes sans lien épidémiologique direct. Autrement le recombinant est classé comme unique (Robertson *et al.* 2000). À ce jour, 68 CRF ont été répertoriés (CRF01\_AE à CRF72\_BF), et on estime qu'ils comptent pour 20% des infections dans le monde (Hemelaar 2012; Lau and Wong 2013; Pessoa *et al.* 2014; Tebit and Arts 2011).

À l'origine de cette énorme diversité, la flexibilité génétique intrinsèque au VIH-1, qui mute spontanément, mais également la pression sélective propre à l'hôte qui façonne l'évolution virale.





**Figure 9. Distribution des sous-types et des recombinants du VIH-1 dans le monde. La surface relative des zones des camemberts représente le nombre relatif de personnes vivant avec le VIH dans la région.**

Tiré de (Hemelaar 2012).

## 4.1. Origine de la diversité du VIH-1

### 4.1.1. La composante stochastique : mutations et recombinaison

Une des caractéristiques propre aux rétrovirus et particulièrement au VIH-1 est la dynamique de réplication rapide doublée d'une capacité intrinsèque à muter et à recombiner entraînant une grande diversité génétique intra et inter-individus (Coffin 1992; Wei *et al.* 1995). Ainsi, sans aucune influence extérieure, le VIH-1 est capable d'évoluer génétiquement et d'établir une quasispèce, comme le montrent certaines études *in vitro* (Sanchez-Palomino *et al.* 1993).

À l'origine de cette diversité, la transcriptase inverse du virus qui n'a pas d'activité de «*proofreading*», typiquement retrouvée chez les polymérase à ADN, qui assure que le nouveau brin d'ADN synthétisé est conforme au brin d'ARN matrice. En résulte un taux de mutation d'approximativement  $3,4 \times 10^{-5}$  mutations par paire de base par cycle de réplication. Le génome du VIH-1 ayant une longueur de 10 kb et  $1 \times 10^{10}$  virions pouvant être produits par jour chez un individu infecté, on estime que des millions de variantes différentes sont produits quotidiennement chez un seul patient, menant à la création de la quasispèce (Perelson *et al.* 1996).

Un second phénomène amène un degré supplémentaire de diversité. Il s'agit de la recombinaison génétique entre deux variantes différentes au sein de la même cellule qui survient quand la transcriptase inverse saute d'un brin d'ARN à un autre durant la réplication (Blackard *et al.* 2002; Robertson *et al.* 1995). Le taux de recombinaison du VIH-1 est l'un des plus élevé de tous les organismes : on l'estime à 3 recombinaisons par cycle de réplication (Zhuang *et al.* 2002). Les CRF et URF sont issus de cette recombinaison entre des virus de clade différents lorsque l'individu est infecté par 2 ou même plusieurs sous-types différents (Artenstein *et al.* 1995; Cornelissen *et al.* 2012; Gerhardt *et al.* 2005; Plantier *et al.* 2004; Zhu *et al.* 1995).

#### **4.1.2. La composante environnementale : la pression sélective**

Cette dynamique d'évolution rapide permet au VIH-1 d'échapper aux contraintes environnementales que sont la réponse immunitaire de l'hôte, les ARV ou encore la disponibilité de cibles cellulaire (Fauci *et al.* 2008; Goulder and Watkins 2004; McGovern *et al.* 2013). Ces contraintes qui poussent le virus à évoluer sont appelées pressions sélectives. Alors que la pression exercée par les ARV pousse le virus à accumuler certaines mutations particulières, la pression sélective exercée par le système immunitaire pousse le virus à évoluer vers une plus grande diversité génétique en accumulant des mutations variées.

**La pression immunitaire : ciblant principalement les épitopes anticorps, LTC et T auxiliaires.**

Les réponses adaptatives médiées par les anticorps neutralisants (Richman *et al.* 2003; Wei *et al.* 2003), les cellules T auxiliaires (Ross and Rodrigo 2002b) ou les lymphocytes T cytotoxiques (Kelleher *et al.* 2001; Ogg *et al.* 1998; Phillips *et al.* 1991; Yusim *et al.* 2002) sont impliquées dans les défenses de l'hôte et contrôlent l'infection à VIH-1, exerçant de ce fait une pression immunitaire sur les régions codantes du génome viral.

L'évolution du VIH-1 contrecarre ces activités en accumulant des mutations non-synonymes, empêchant ainsi la reconnaissance par ces effecteurs immuns grâce à une variété de mécanismes : l'interférence avec l'attachement des épitopes aux molécules du CMH, la réduction de la reconnaissance par les récepteurs des cellules T, ou encore la génération de réponse LTC antagonistes (Moore *et al.* 2002). L'échappement à la réponse CD8 est d'ailleurs l'une des forces majeures qui favorise l'émergence de la diversité génétique des séquences du VIH-1 dans les régions codant pour des protéines (Allen *et al.* 2005a; Brumme *et al.* 2007; Carlson *et al.* 2015; Jones *et al.* 2004; Soudeyns *et al.* 1999).

### **Calcul**

Cette pression sélective se manifeste au niveau des codons par un excès de substitutions non-synonymes par rapport aux substitutions synonymes (Nei and Gojobori 1986). Elle est également appelée  $\omega$  et se calcule comme le ratio entre le taux de mutations non-synonymes par sites non-synonymes (dn) sur le taux de mutations synonymes par sites synonymes (ds) ( $\omega = dn/ds$ ). Une valeur de  $\omega > 1$  indique une pression sélective diversifiante tandis qu'un  $\omega < 1$  indique au contraire que le site est sous une contrainte purifiante.

### **Différences de pression sélective selon la région du génome**

Le génome du virus n'est pas soumis de façon uniforme à la pression sélective. En effet, 12% du génome viral est soumis à une pression sélective liée à la réponse immunitaire adaptative, les 2/3 du restant sont relativement conservés. Cette conservation du génome est principalement déterminée par la structure de l'ARN viral (Snoeck *et al.* 2011) mais également par la structure protéique (Woo *et al.* 2010), les hélices alpha autorisant une moins grande variabilité.

L'échappement est restreint par les contraintes fonctionnelles et structurales particulières aux épitopes qui sont nécessaires à la survie du virus (Carlson *et al.* 2015; McMichael and Klenerman 2002). Des mutations dans ces régions du génome ne se font pas sans perte de *fitness* du virus et peuvent être délétères pour le virus (Liu *et al.* 2007; Liu *et al.* 2014).

L'enveloppe est le gène le plus sélectionné du génome suivi de loin par *gag* et *pol* qui sont les 2 gènes les moins soumis à cette pression diversifiante (Liu *et al.* 2006).

### **Importance du CMH dans la diversité génétique du virus**

La réponse immune va ainsi façonner l'évolution du virus au cours de la maladie. Il s'agit de la pression sélective qui est fonction de l'immunocompétence relative des patients et tributaire du type HLA.

Les individus avec des allèles HLA qui sélectionnent préférentiellement des régions protéiques du VIH-1 qui supportent moins bien les mutations à cause de leurs effets sur le « fitness » verront leur maladie progresser plus favorablement vu que le potentiel de développement de mutants d'échappement sera réduit (Heeney *et al.* 2006). Ceci est fort bien illustré par cas des allèles de CMH de classe I HLA-B\*57 et HLA-B\*27 ; ce dernier reconnaît des épitopes conservés de la protéine de la capsid p24 et est associé à un taux de survie accru chez les sujets infectés (contrôleurs élites). Ces individus sont capables de maintenir des niveaux élevés de LTCD4<sup>+</sup> et une virémie faible sans avoir recours à la thérapie antirétrovirale (Bailey *et al.* 2006; Carlson *et al.* 2015). A l'inverse, certains allèles du CMH de classe I, dont HLA-B\*35, sont associés à une progression rapide de la maladie (Willberg *et al.* 2010).

### **Variation au cours de la maladie**

La réponse immunitaire spécifique au VIH-1 sélectionne des mutants d'échappement durant les phases aiguës (Borrow *et al.* 1997; Cao *et al.* 2003; Jones *et al.* 2004; Price *et al.* 1997) et à un moindre niveau durant la phase chronique de l'infection (Allen *et al.* 2004; Allen *et al.* 2005b; Draenert *et al.* 2004; Geels *et al.* 2003; Jones *et al.* 2004; Koibuchi *et al.* 2005; Price *et al.* 1997; Wolinsky *et al.* 1996). Les études *in vitro* montrent qu'une suppression incomplète du VIH-1 par les CTL, résulte en la sélection et l'émergence rapide de mutants d'échappement (Yang *et al.* 2003).

La coévolution virus-hôte est aussi importante en ce qui concerne la progression de la maladie (Letvin and Walker 2003; Pantaleo and Fauci 1996). L'évolution virale peut être largement façonnée par les pressions antivirales exercées par le système immunitaire de l'hôte (Moore *et al.* 2002; Yang *et al.* 2003).

Le degré de sélection des séquences du VIH-1 associée au HLA est prédictif de la charge virale et est un marqueur de progression de la maladie (Brumme *et al.* 2008; Moore *et al.* 2002). Ainsi, chez un individu, une grande diversité génétique est souvent associée à une forte pression sélective et témoigne d'une réponse immunitaire robuste résultant en une évolution plus lente de la maladie. En effet, de nombreuses études ont montré qu'il existe une corrélation positive entre la diversité génétique/pression sélective et la vitesse de progression de la maladie, faisant de la pression sélective un bon prédicteur pronostic ou de l'état immunitaire du patient (Ross and Rodrigo 2002a; Strunnikova *et al.* 1998).

Une grande diversité génétique intra-hôte a été associée à une progression plus lente de la maladie (Ganeshan *et al.* 1997; Wolinsky *et al.* 1996). Cependant, cette diversité génétique est de fait une diversité liée à la pression sélective. La sélection positive est plus importante chez les patients présentant une évolution lente de la maladie car leur population virale montre un plus fort taux d'adaptation due à une réponse immunitaire plus robuste (Ross et Rodrigo 2002, Vici di *et al.* 1999, Williamson *et al.* 2003, Zanotto *et al.* 1999). De plus, un ralentissement évolutif apparaît tard dans l'infection à VIH-1, qui est causé par l'affaiblissement du système immunitaire plutôt qu'à une réduction de la réplication virale en raison de la disparition des cellules susceptibles au virus (Lemey *et al.* 2007; Williamson 2003).

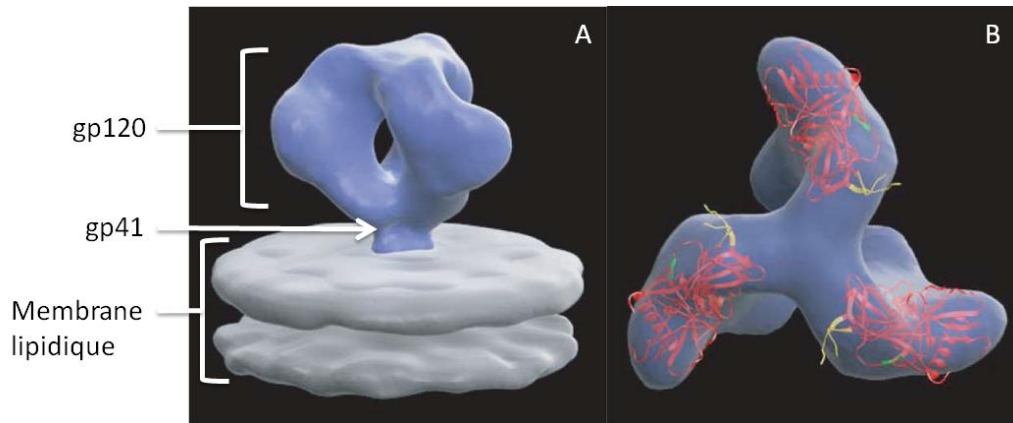
La compréhension de la complexité de la réponse immunitaire et des mécanismes par lesquels le VIH-1 échappe à ces réponses est cruciale au développement de vaccins efficaces. La diversité du virus et l'échappement à la réponse immunitaire, sont des barrières majeures au contrôle soutenu du VIH-1 ainsi qu'au développement de vaccins efficaces (Barouch *et al.* 2002; Carlson *et al.* 2015).

## 5 La glycoprotéine d'enveloppe et l'entrée virale

La glycoprotéine d'enveloppe est la seule protéine virale exposée à la surface du virion. Elle est de ce fait soumise à une pression sélective intense exercée par la réponse immunitaire de l'hôte, étant une cible privilégiée des anticorps neutralisants mais également la cible des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Parren *et al.* 1997b; Soudeyns *et al.* 1999). L'enveloppe détermine également le tropisme du virus de par la préférence du corécepteur CCR5 ou CXCR4 ou encore d'autres corécepteurs alternatifs (Pollakis and Paxton 2012). Par conséquent, des nombreuses caractéristiques génétiques spécifiques de l'enveloppe telles que la diversité en acides aminés, le nombre de sites de N-glycosylation et la longueur des boucles variables sont associées à la neutralisation des anticorps, au tropisme du virus mais également à la transmission (Rademeyer *et al.* 2007; Resch *et al.* 2001; Wei *et al.* 2003). L'enveloppe représente une cible évidente pour le développement de vaccin (Burton *et al.* 2004; Mascola *et al.* 1999; Pognard *et al.* 2001) mais également une cible pour la classe d'antirétroviraux que sont les inhibiteurs d'entrée (Henrich and Kuritzkes 2013).

### 5.1. Structure et fonction de l'enveloppe

La protéine d'enveloppe se présente comme des spicules à la surface de la particule virale (Julien *et al.* 2013; Liu *et al.* 2008; Lyumkis *et al.* 2013). On dénombre en moyenne 14 spicules (de 4 à 35) à la surface des particules virales du VIH-1 (Zhu *et al.* 2006). Ces spicules sont des trimères composés de 3 hétérodimères gp120-gp41 (Caffrey *et al.* 1998; Chan *et al.* 1997; Doms 2000; Weissenhorn *et al.* 1997) (Figure 10)



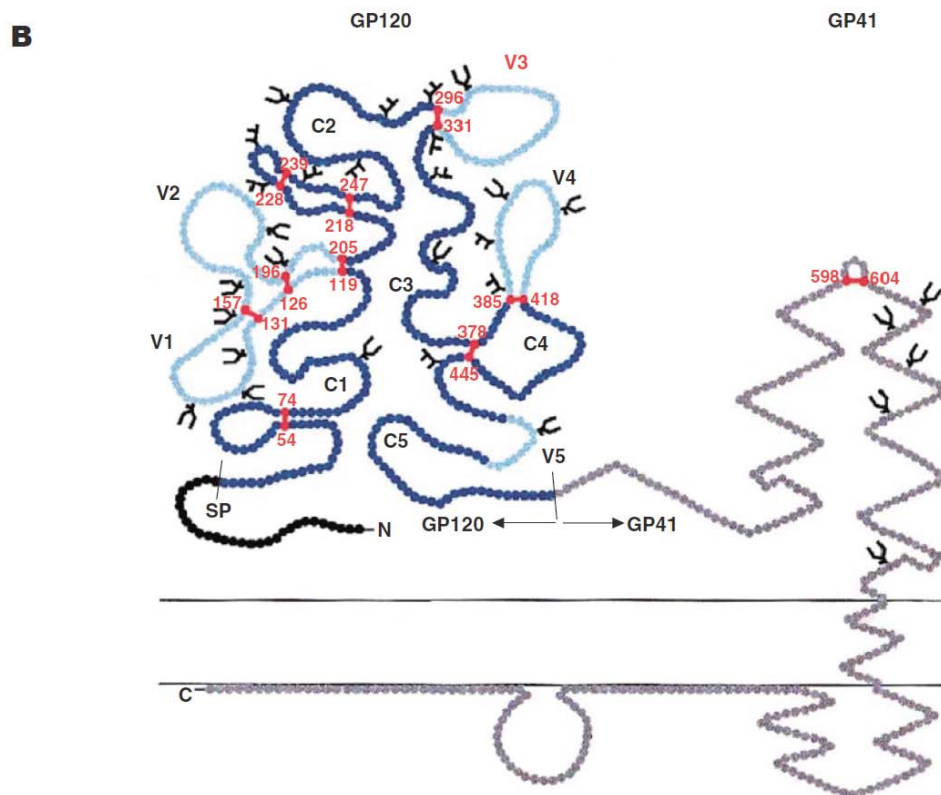
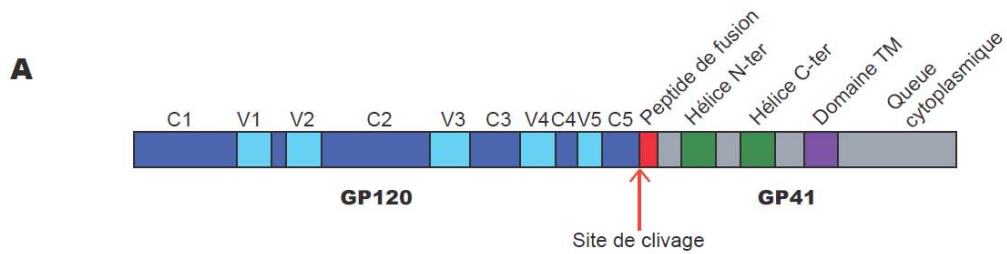
**Figure 10. Structure native de l'enveloppe trimérique à la surface des particules virales.**

Vue de face (A), vue de haut (B). Le core de la gp120 est représenté en rouge, les boucles hypervariables V1V2 et V3 sont représentée en jaune et vert respectivement. Tiré de (Liu *et al.* 2008)

### 5.1.1. Synthèse et modifications post-traductionnelles

La protéine d'enveloppe du VIH-1 est d'abord synthétisée en tant que molécule précurseur fortement glycosylée d'environ 845 à 870 acides aminés, la gp160, protéine transmembranaire de type I, qui sera plus tard clivée en gp120 et gp41. Dans le réticulum endoplasmique (RE), la gp160 s'oligomérisse et subit les modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation et l'ajout de ponts disulfures (Earl *et al.* 1991; Land *et al.* 2003). Les ponts disulfures sont principalement ajoutés à la base des régions variables de la gp120 qui forment ainsi des boucles (Leonard *et al.* 1990). Ces boucles hypervariables sont au nombre de 5 (V1-V5) et sont séparées par des régions constantes (C1 à C5). La glycosylation, majoritairement ajoutée dans les boucles variables, permet entre autre le repliement adéquat de la protéine (Land and Braakman 2001; Leonard *et al.* 1990). La partie gp41 comprend le peptide de fusion, une région transmembranaire, ainsi qu'une queue cytoplasmique (Chan *et al.* 1997) (Figure 11).

Plus tard, dans l'appareil de golgi, la gp160 est clivée par des protéases cellulaires telles que la furine en gp120 sous-unité de surface de 120 Kda et gp41 sous unité transmembranaire de 41 Kda (Vollenweider *et al.* 1996) (Figure 11). Ces deux sous-unités demeurent liées de façon non-covalente au sein des trimères qui seront transportés jusqu'à la membrane cellulaire où ils seront incorporés au virion bourgeonnant (Ono 2010).



**Figure 11. Organisation structurale (A) et représentation schématique (B) du précurseur gp160.**

B) Le peptide signal est indiqué en noir (SP). La glycoprotéine de surface gp120 est indiquée en bleu, les régions conservées en bleu foncé (C1-C5) et les boucles variables en bleu clair (V1-V5). La glycoprotéine transmembranaire gp41 est représentée en gris et contient une boucle formée par un pont disulfure. Les sites de N-glycosylation des chaînes mannosides (F) et des chaînes glycosidiques complexes (Y) sont indiqués. Les résidus cystéine sont numérotés et indiqués en rouge, ainsi que les ponts disulfures. Tiré de (Pancera 2005).



## 5.1.2. La gp120

### a) Structure moléculaire

La structure moléculaire du cœur (ou core) de la gp120 a été résolue par le groupe de Hendrickson en 1998 grâce à la cristallisation de la protéine liée à la molécule CD4 ainsi qu'au fragment Fab de l'anticorps 17b dirigé contre le site de fixation des corécepteurs (Kwong *et al.* 1998). Le cristal n'était réalisable qu'après une déglycosylation extensive de la protéine, la délétion des boucles hypervariables V1 V2 et V3 (considérées comme des structures trop désorganisées), et fixation avec la molécule CD4 et/ou un anticorps, seule méthode permettant de rigidifier la structure. Récemment la structure cristalline du trimère comprenant les boucles hypervariables a été déterminée par le groupe de Ward (Lyumkis *et al.* 2013).

Le cristal du core de la gp120 révèle une protéine globulaire divisée en 3 domaines : un domaine interne et un domaine externe reliés par un feuillet  $\beta$  interdomaine, la lame pontante (*bridging sheet*). Le domaine interne est par définition la partie interne du trimère, enfoui dans le trimère, il se situe à l'interface entre les monomères de gp120 et la gp41. Il contient principalement les régions constantes C1 et C5 ainsi qu'une partie de C2, V1 et V2 font également partie du domaine interne. Le domaine externe, quant à lui est la partie exposée à la surface du trimère, contient la majorité des sites de N-glycosylation. La lame pontante fait la liaison de ces 2 domaines, il est composé de 4 brins  $\beta$  :  $\beta 2$  et  $\beta 3$  provenant du domaine interne, et  $\beta 20$  et  $\beta 21$  du domaine externe (Kwong *et al.* 1998) (Figure 12).

Les structures atomiques de V1V2 et V3 ont été résolues grâce à la cristallisation de la gp120 avec des anticorps monoclonaux liant ces régions. Toujours dans la forme liée de la gp120, V3 montre une protrusion vers membrane de la cellule cible (Huang *et al.* 2005). Sa structure en tête d'épingle  $\beta$  ( $\beta$  hairpin) est similaire à celle des ligands des corécepteurs CCR5 (RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) et CXCR4 (SDF-1) (Sharon *et al.* 2003). La structure de V1V2 a été résolue en 2011, la région correspond un feuillet  $\beta$  à 4 brins antiparallèles stabilisés par des ponts disulfures. Les brins  $\beta$  correspondent aux parties les plus conservées de V1 et V2, les parties

hypervariables, très propices à l'addition/délétion d'acides-amino et particulièrement de sites de glycosylation, sont elles libres et forment des boucles (McLellan *et al.* 2011).

Ces configurations ont été confirmées par le nouveau cristal de Lyumkis, qui montre V1V2 et V3 à l'apex du trimère, avec V2 localisé au dessus du site d'attachement à CD4, dans une position restreignant l'accès à l'épitope. V3 est située directement sous V1V2 et est masqué par V2 qui forme un bouclier. Le trimère apparaît comme assemblé via des interactions intra et inter-protomères à l'apex impliquant V1V2 et V3 (Lyumkis *et al.* 2013) (Figure 12).

### **b) Domaines fonctionnels**

Les domaines fonctionnels de la protéine sont constitués de régions discontinues dans la structure primaire qui deviennent contiguës dans la structure tridimensionnelle (Figure 13).

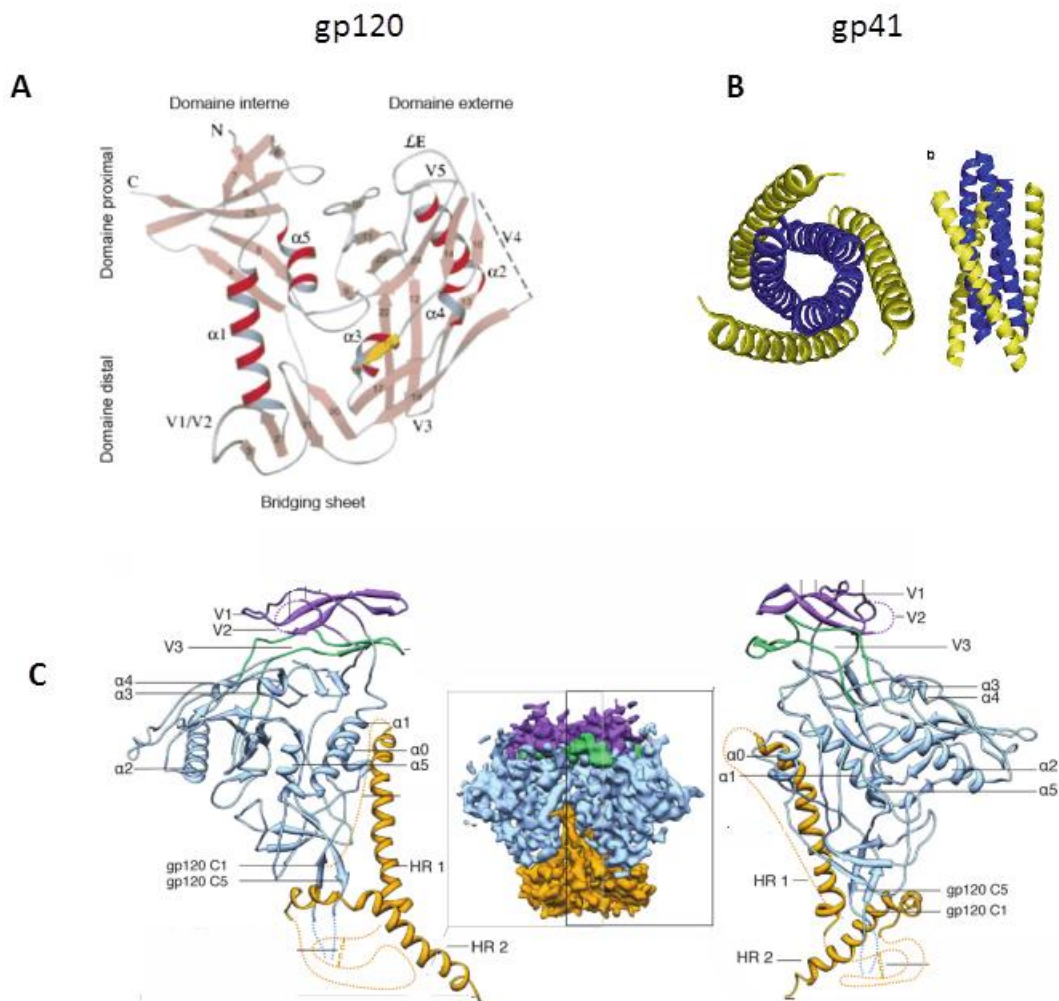
- Le domaine de liaison à CD4 : CD4 se lie à la gp120 au niveau d'une cavité hydrophobe située à l'interface entre les domaines internes et externes. Ce domaine de liaison est formé de structure discontinues situées dans les 5 régions constantes (Figure 12) (Kwong *et al.* 1998)
- Le site de liaison au corécepteur : Communément appelé CD4i épitope (pour CD4 induced) ce site est exposé aux anticorps après la liaison au CD4. De nombreuses études ont aboutit à une cartographie de ce site de liaison qui est lui aussi disséminé sur plusieurs segments de la gp120 (Cormier *et al.* 2001; Rizzuto and Sodroski 2000; Rizzuto *et al.* 1998). Principalement, le site de liaison au corecepteur consiste en la lame pontante, hautement conservée, et la boucle V3 (Cormier and Dragic 2002). On retrouve également des sites de liaison dans les régions C1, C2, C3 et C4. Dans C3 il y a chevauchement avec le site de liaison à CD4. (Choe *et al.* 1996; Cocchi *et al.* 1996) (Figure 12).

Le site de liaison à l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  : situé dans la région V2, un tripeptide (motif LDV ou LDI) permet la liaison de la gp120 à une l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  sur les lymphocyte T CD4<sup>+</sup>. Cette intégrine est originellement responsable du ciblage des leucocytes à la lamina propria du tissue digestif (Arthos *et al.* 2008).

### 5.1.3. La gp41

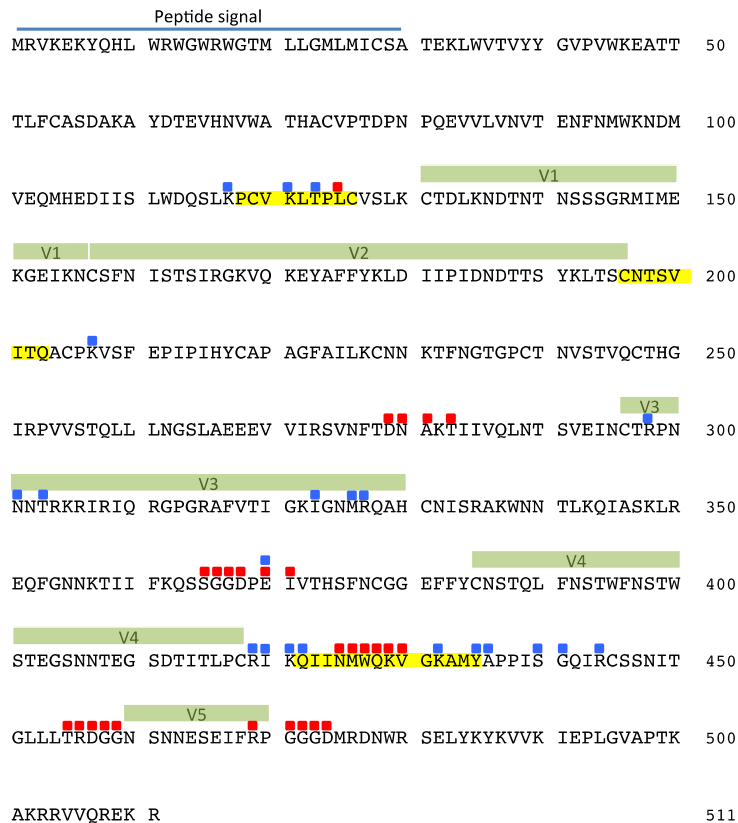
La structure de la gp41 quand à elle fut résolue en 1997 (Chan *et al.* 1997). Sa structure est beaucoup plus simple que celle la gp120, elle possède une région extra-cellulaire N-terminale, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique. L'extrémité N-terminale contient le peptide de fusion, région hydrophobe. La région extra-cellulaire comprend deux régions de répétitions d'heptapeptides contigus, HR1 (HR-N) en N-terminale et HR2 (HR-C) en C terminale qui forment l'ectodomaine. Ces 2 régions contiennent chacune une hélice  $\alpha$  (N36 et C34) qui sont responsables de la formation d'une structure en faisceau d'hélices torsadées (coiled-coils) à 6 hélices (6HB : 6 helix bundle) (Figure 12). On a longtemps cru que la structure 6HB existait déjà dans le trimère au repos (non-lié à CD4) à la surface du virus (Chan *et al.* 1997; Weissenhorn *et al.* 1997), mais des études récentes réfutent ce modèle, montrant une conformation toute autre de la gp41, laissant présager que la formation du 6HB n'intervient qu'après liaison du CD4 lors de la fusion membranaire. (Dimitrov *et al.* 2005; Lyumkis *et al.* 2013; Mao *et al.* 2012) (Figure 12).

Le domaine transmembranaire ancre l'enveloppe dans la membrane lipidique et la queue cytoplasmique joue un rôle complexe dans l'empaquetage, l'infectivité et la pathogénicité cellulaire (Yang *et al.* 2010)



**Figure 12. Structure de la gp120, gp41 et du trimère à la surface du virus.**

**A)** Structure du core de la gp120 (Kwong *et al.* 1998) diagramme représentant les hélices alpha en rouge, et les feuilletts beta en rose. Le domaine interne de la gp120, située sur la face interne du trimère est aussi la partie entrant en contact avec la gp41, tandis que le domaine externe correspond à la surface externe de la protéine portant la majeure partie de la glycosylation. La lame pontante, constituée des feuilletts beta 2, 3, 20 et 21 sont situés à la surface proximale de la protéine, faisant face à la membrane cellulaire, en opposition au domaine distal (N et C terminal) qui est situé à proximité de la membrane virale. **B)** Structure atomique du 6HB de la gp41 (Horne *et al.* 2009) (Chan *et al.* 1997). Les 3 hélices centrales (HR-1) sont en bleu, les 3 hélices HR-2 sont en jaune. Les hélices HR-C sont placées de façon anti-parallèles par rapport aux hélices HR-N. Panel de gauche : Vue du haut. Panel de droite : vue du complexe par le côté. **C)** Conformation et organisation des sous-unités de l'enveloppe à la surface de la particule dans sa forme non-liée (Lyumkis *et al.* 2013). Vue de coté de l'hétéro-trimère (panel central). La gp41 est représentée en jaune. La gp120 est présentée en bleu avec les boucles V1V2 (violet) et V3 (vert).



**Figure 13. Séquence de la gp120 du VIH-1 et domaines fonctionnels.**

La séquence de l'enveloppe de la souche HXB2, souche de référence, est représentée. Les boucles hypervariables et le peptide signal sont représentés. Les points bleus indiquent les résidus contribuant à la liaison au corécepteur (Cormier *et al.* 2001; Rizzuto and Sodroski 2000; Rizzuto *et al.* 1998). Les points rouges indiquent les résidus en contact avec CD4 (Kwong *et al.* 1998). La lame pontante est représentée en jaune. Inspiré de (Decker *et al.* 2005).

#### 5.1.4. La glycosylation

L'enveloppe du VIH-1 est l'une des protéines les plus glycosylées dans la nature. En effet, la gp160 possède environ 30 sites potentiels de N-glycosylation, dont 25 se retrouvent dans la gp120, ce qui équivaut à 3-4 fois plus de glycosylation que ce qui est retrouvé dans d'autres protéines d'enveloppe virales (Zhang *et al.* 2004). Cette glycosylation qui représente approximativement 50% de la masse de l'enveloppe est composée quasi-exclusivement de N-

glycans avec une très faible proportion de O-glycans. (Bernstein *et al.* 1994; Doores *et al.* 2010; Huang *et al.* 1997).

Ces oligosaccharides sont ajoutés au fur et à mesure que la protéine est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et sont subséquentement modifiés dans l'appareil de Golgi. L'addition de ces carbohydrates est nécessaire au bon repliement, à l'apprêtement et au transport efficace de la gp160 vers la membrane plasmique (Fenouillet and Jones 1995; Li *et al.* 1993).

Les O-glycans sont des oligosaccharides ajoutés à plusieurs résidus serine ou thréonine non-identifiés de la gp120 ; leur rôle reste très peu connu comparativement aux N-Glycans. Ces derniers, par définition, sont des groupements carbohydrates ajoutés à une arginine (N) dans une séquence consensus N-X-S ou N-X-T dans laquelle X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline et S et T représentent la serine ou la thréonine. Parmi les N-glycans, on distingue les oligosaccharides riches en mannose et les oligosaccharides complexes qui sont des modifications des premiers par « trimming » et addition de monosaccharides autres que le mannose (Leonard *et al.* 1990; Zhu *et al.* 2000) En général, les glycans complexes sont présents dans les régions variables et les glycans riches en mannose se retrouvent dans les régions constantes (Leonard *et al.* 1990; Zhu *et al.* 2000). Leur nombre exact varie entre les sous-types et les souches. Toutefois, de nombreux sites de N-glycosylation restent très conservés (Figure 11).

La glycosylation couvre des portions antigéniques de l'enveloppe et l'augmentation du nombre de sites de N-glycosylation sur la gp120, notamment dans les boucles hypervariables, est associée à une résistance accrue à la neutralisation médiée par les anticorps. La flexibilité de ce manteau de glycans favorise ainsi l'évasion immunitaire (Bunnik *et al.* 2010a; Bunnik *et al.* 2010b; Wei *et al.* 2003) De nombreuses études ont démontré que la glycosylation sur la gp120 facilite l'échappement du virus à la réponse immunitaire en bloquant l'accès à des épitopes reconnus par des anticorps neutralisants critiques et même empêchent la reconnaissance par les CTL (Doe *et al.* 1994; Duenas-Decamp *et al.* 2008; Granados-Gonzalez *et al.* 2008; Li *et al.* 2008; Ly and Stamatatos 2000; McCaffrey *et al.* 2004; Mori *et al.* 2001)

En effet, la délétion des sites de N-glycosylation sur les régions C2, V1V2, V3 et de la face silencieuse de la gp120 par mutagenèse dirigée augmente la susceptibilité des virus aux anticorps neutralisants (Li *et al.* 2008; Ly and Stamatatos 2000; McCaffrey *et al.* 2004; Wolk and Schreiber 2006). De plus, le traitement par des endoglycosidases de la gp120 dérivée de cellules de mammifères accroît son immunogénicité (Doe *et al.* 1994).

Néanmoins, les N-glycans de la gp120 peuvent également être la cible de la réponse immunitaire (Perdomo *et al.* 2008; Sirois *et al.* 2007; Wang 2006). L'anticorps largement neutralisant 2G12 reconnaît un noyau relativement bien conservé d'oligomannoses protubérant à la surface de la gp120 (Calarese *et al.* 2003; Sanders *et al.* 2002). Aussi, un N-glycan particulier est requis pour la reconnaissance efficace de l'épitope T auxiliaire adjacent (Li *et al.* 2008). En conclusion, la présence ou l'absence de N-glycosylation particulière sur la gp120 peuvent grandement influencer la reconnaissance de ces antigènes par la réponse humorale et à médiation cellulaire.

Les sucres riches en mannose de la gp120 sont également capables de lier les molécules telles que les lectines à la surface des cellules. La liaison de tels récepteurs cellulaires sert d'ancrage mais aussi de point d'entrée du virus dans certaines cellules. Ainsi, sur les cellules dendritiques, la gp120 s'attache au DC-SIGN et peut ainsi être transporté vers les ganglions lymphatiques où le virus pourra infecter en *trans* les cellules CD4<sup>+</sup> permissives (Geijtenbeek *et al.* 2000).

Enfin, la présence ou l'absence de sites potentiels de N-glycosylation dans les boucles variables V1V2, V3 et V4 a été associée à l'utilisation des corécepteurs CCR5 ou CXCR4 (Clevestig *et al.* 2006; Dash *et al.* 2008; Pollakis *et al.* 2001)

## **5.2. L'entrée virale**

L'entrée virale se fait en plusieurs étapes séquentielles comprenant des changements conformationnels de la gp120 et de la gp41 aboutissant à la fusion entre les membranes virale et cellulaire. Ces changements sont déclenchés par la liaison de la gp120 à CD4. La gp120

s'attache premièrement au récepteur (CD4) puis au corécepteur, et enfin la gp41 entame le processus de fusion membranaire. Des études récentes ont montré l'extrême flexibilité de la structure de la gp120 permettant des changements conformationnels sans déstabiliser l'interaction gp120-gp41 (Chen *et al.* 2005; Desormeaux *et al.* 2012; Pancera *et al.* 2010).

### 5.2.1. Les récepteurs du VIH-1

#### a) Le récepteur d'entrée : la molécule CD4

La molécule CD4 est le récepteur principal du VIH-1 (Dalglish *et al.* 1984; Maddon *et al.* 1986; Sattentau *et al.* 1988). CD4 fait partie de la superfamille des immunoglobulines et possède 4 domaines extracellulaires immunoglobuline-like (D1 à D4), un segment transmembranaire et une queue cytoplasmique associée à la tyrosine kinase p56<sup>lck</sup>. CD4 est exprimée principalement sur les lymphocytes T auxiliaires (LTCD4<sup>+</sup>), incluant les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves, centrales, et effecteurs mémoires. Sa fonction principale est la reconnaissance du CMH de classe 2 à la surface des cellules présentatrices d'antigène (Janeway 1992) et d'assister le récepteur des cellules T (TCR) à l'activation de la cellule après reconnaissance antigénique. CD4 est également exprimée par des cellules n'exprimant pas le TCR, telles que les monocytes, macrophages et cellules dendritiques, ce qui fait de ces cellules des cibles additionnelles du virus (Ravichandran *et al.* 1996).

L'interaction CD4-gp120 est très conservée parmi les primates. CD4 se lie à la gp120 par son domaine N-terminal D1. Plusieurs résidus dans cette région entrent en contact avec les résidus chargés négativement logés dans la cavité qu'est le site d'attachement au CD4 sur la gp120 (Kwong *et al.* 1998).

#### b) Les corécepteurs : CCR5 et CXCR4

Le premier corécepteur du VIH-1 a été identifié en 1996 par l'équipe de Berger (Feng *et al.* 1996). Il s'agissait de CXCR4 alors appelé fusine. La même année, plusieurs groupes décrivent le CCR5, à l'époque CKR-5, en tant que 2<sup>ième</sup> corécepteur du VIH-1 (Alkhatib *et al.*



1996; Deng *et al.* 1996; Dragic *et al.* 1996). Depuis, CCR5 et CXCR4 sont reconnus en tant que corécepteurs principaux du VIH-1 et l'utilisation de l'un ou l'autre de ces 2 récepteurs définit le tropisme du virus. Les virus capables d'utiliser le CCR5 sont appelés virus R5 et ceux capables d'utiliser CXCR4 sont appelés X4.

Une vingtaine de corécepteurs alternatifs ont été décrits et peuvent être utilisés par le VIH-1 pour infecter les cellules, mais la pertinence physiologique de ces corécepteurs n'a pas encore été mise en évidence (Coetzer *et al.* 2011; Nedellec *et al.* 2009; Shimizu *et al.* 2009; Simmons *et al.* 2000).

Les corécepteurs du VIH-1 font partie de la famille des récepteurs de chimiokines à 7 domaines transmembranaires et sont donc des récepteurs couplés aux protéines G. Les récepteurs des chimiokines forment des tiges dans la membrane cellulaire avec un pore central entouré des 7 domaines transmembranaires. Les domaines exposés à la surface sont la queue N-terminale et les 3 boucles extracellulaires appelées E1, E2 et E3 (Lebon and Tate 2012). Ils peuvent former des homodimères ou des hétérodimères comme c'est le cas pour CCR5 (Vazquez-Salat *et al.* 2007).

Il existe 3 ligands connus à CCR5 qui sont CCL3, CCL4 et CCL5 aussi connus sous les appellations MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , et RANTES, respectivement (Combadiere *et al.* 1996; Raport *et al.* 1996; Zaitseva *et al.* 1997). L'unique ligand de CXCR4 est CXCL12 ou SDF1 dont l'inactivation est létale chez la souris (Bleul *et al.* 1996).

Le domaine N-terminal est nécessaire à la fonction corécepteur de CCR5 (Doranz *et al.* 1997) et de CXCR4 (Brelot *et al.* 1997). Ce domaine subit des modifications post-traductionnelles via l'addition d'un manteau sulfaté sur les résidus tyrosines, ce qui faciliterait les interactions électrostatiques avec les acides aminés chargés positivement de la lame pontante et de la base de V3 (Farzan *et al.* 1999).

Il y a de multiples régions du corécepteur impliquées dans la liaison à gp120, les 2 régions les plus importantes étant E2, pour la fixation de la boucle V3, (Wu *et al.* 1997) et la queue N-

terminale du corécepteur qui se lie à la lame pontante et à V2. Toutefois, d'autres domaines pourraient être impliqués dans l'attachement (Decker *et al.* 2005; Huang *et al.* 2005).

## 5.2.2. Étapes séquentielles de l'entrée virale

### a) L'attachement et la liaison à CD4

L'entrée virale commence par l'attachement du virion à la surface cellulaire. Cet attachement peut être facilité par la liaison des groupements carbohydrates de la gp120 à des lectines de la surface cellulaire telles que le DC-SIGN (Baribaud *et al.* 2001; Geijtenbeek *et al.* 2000; Mondor *et al.* 1998). Cette interaction toutefois non-nécessaire facilite l'entrée virale, bien que son importance physiologique soit floue.

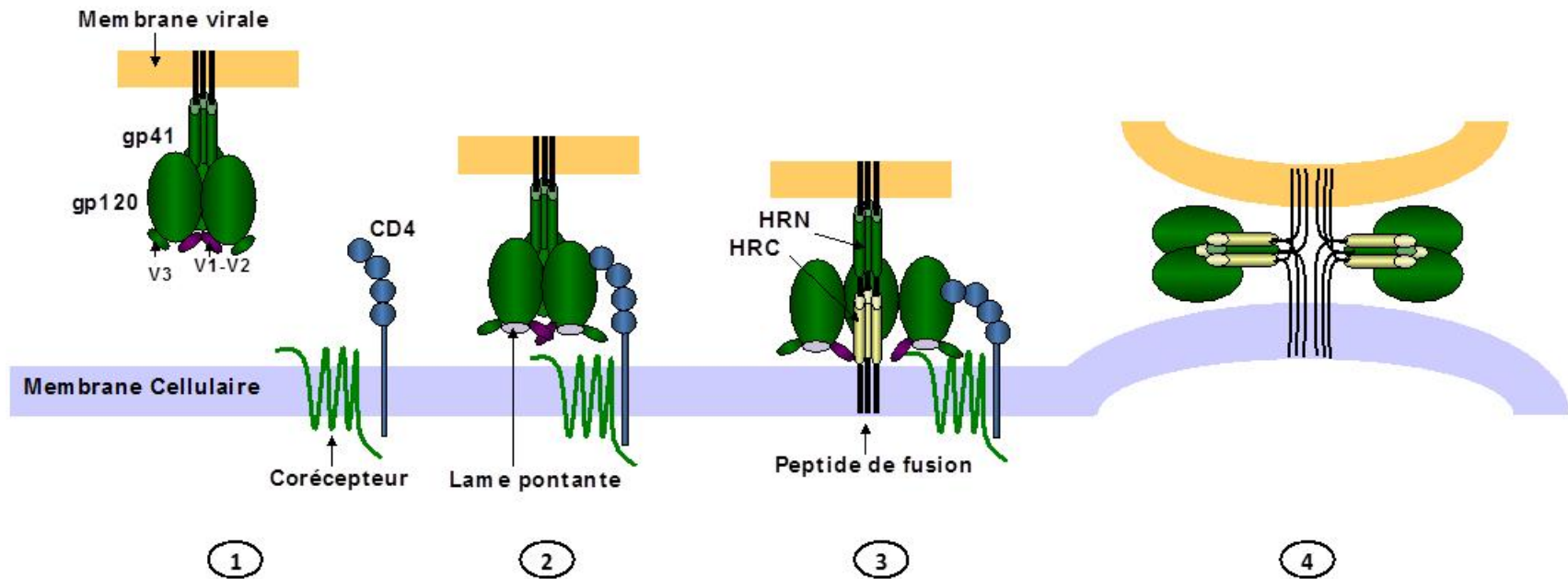
Chaque monomère de gp120 contient un site de liaison à CD4, et l'engagement d'une seule gp120 peut induire le changement de conformation du trimère entier (Salzwedel and Berger 2000). La liaison de la gp120 à CD4 induit un changement de conformation qui entraîne la formation du site de liaison au corécepteur. En effet, la structure de cristalline de la gp120 de SIV non lié à CD4 laisse entrevoir la conformation « au repos » de la gp120 dans laquelle la lame pontante n'est pas formée mais disloquée, et la boucle V3 enfouie dans la protéine globulaire (Chen *et al.* 2005). Les réarrangements séquentiels de l'enveloppe induits par la liaison à CD4 interviennent comme suit. Premièrement, la boucle V1V2 est déplacée du centre vers la périphérie du trimère laissant le champ à un réarrangement de V3, premier site de liaison du corécepteur. On observe en effet, un repositionnement et exposition de V3, notamment la couronne, pour former une protrusion vers la membrane cellulaire. S'ensuit un réarrangement des domaines internes et externes entraînant la formation de la lame pontante, par le rapprochement des brins  $\beta 2$  et  $\beta 3$  du domaine interne aux brins  $\beta 20$  et  $\beta 21$  du domaine externe (Huang *et al.* 2005; Rizzuto *et al.* 1998). On pense que ces changements conformationnels induisent une rotation de chaque monomère de gp120 dévoilant partiellement la gp41. De plus, un repliement de CD4 entre les domaines D2 et D3 permettrait le rapprochement de l'enveloppe vers la membrane cellulaire (Liu *et al.* 2008). (Figure 14)

### **b) Liaison au corécepteur**

La liaison au corécepteur se fait via ces domaines révélés par le réarrangement de la gp120 c'est-à-dire via le contact de la couronne de V3 avec la boucle extracellulaire E2 et le contact lame pontante et la queue N-terminale (Rizzuto and Sodroski 2000; Rizzuto *et al.* 1998). La région N-terminale du corécepteur se lie à la base de V3 ainsi qu'à la lame pontante (Choe and Farzan 2009; Cormier *et al.* 2000; Huang *et al.* 2007a) (Figure 4.5)

### **c) La fusion**

Suite à la liaison du corécepteur, des changements de conformation sont alors amorcés dans la gp41. Le peptide de fusion de la gp41, domaine hydrophobe est alors exposé et projeté vers la membrane cellulaire où il va s'ancrer pour permettre un rapprochement des membranes cibles et virales (Tamm and Han 2000). Les régions HR1 et HR2 sont alors rapprochées afin de former une structure en tête d'épingle, ce qui résulte au niveau trimérique en la formation d'un faisceau torsadé à 6 hélices (6HB). Ce 6HB est une structure très stable permettant le rapprochement et la fusion des membranes cellulaires et virales résultant en la formation d'un pore par lequel le contenu du virion sera relâché (Chan *et al.* 1997) (Figure 14).



**Figure 14. Étapes de l'entrée virale.**

1) Enveloppe trimérique fonctionnelle à la surface du virion et récepteur CD4 et corécepteur à la surface de la cellule cible. 2) Liaison de CD4 et changements conformationnels de la gp120 permettant l'exposition des domaines de liaison au corécepteur. 3) Liaison au corécepteur et activation du domaine de fusion de la gp41 qui est inséré dans la membrane cible. 4) Fusion membranaire induite par la formation du 6HB entre les régions HR1 et HR2 de la gp41. Deux trimères d'enveloppe sont représentés dans cette dernière étape.

### 5.2.3. Les inhibiteurs d'entrée

L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible peut être bloquée à plusieurs niveaux des étapes séquentielles décrites ci-haut. Puiseurs inhibiteurs d'entrée de différentes natures ont été testés en essais cliniques, mais pour l'instant, uniquement 2 sont approuvés pour le traitement de l'infection à VIH. Il s'agit du maraviroc, un antagoniste de CCR5 (2009) et de l'enfuvirtide ou T20, un inhibiteur de fusion (Wild *et al.* 1992).

Parmi les inhibiteurs candidats, on distingue les inhibiteurs de l'attachement et de la liaison à CD4, les inhibiteurs de corécepteurs et les inhibiteurs de fusion (Wilén *et al.* 2012) (Tableau 5).

#### a) Inhibiteurs de l'attachement et de la liaison à CD4

Parmi les inhibiteurs de l'attachement et de la liaison à CD4 on retrouve :

- Les polymères anioniques non-spécifiques (inhibiteurs de l'attachement) qui préviennent les interactions électrostatiques entre l'enveloppe positivement chargée et la surface négativement chargée de la cellule cible. Étudiés un temps en tant que composant de microbicides vaginaux, leur efficacité clinique s'est avérée nulle (Tableau 5).
- Les inhibiteurs du site de liaison de CD4 correspondent à de petites molécules qui lient le site de liaison au CD4 sur la gp120. Ils montrent une efficacité *in-vitro*, mais le VIH-1 s'y adapte très rapidement en développant des résistances (Tableau 5).
- Le CD4 soluble, ayant une activité *in-vitro* non négligeable, montre une totale inefficacité en clinique possiblement due à la bio-disponibilité de la molécule (Tableau 5).
- Les inhibiteurs d'expression de CD4, dérivés du cyclotriazadisulfonamide (CADA), diminuent l'expression du CD4 à la surface des cellules par un mécanisme inconnu. Ce produit est encore en cours d'essais cliniques. (Tableau 5)

### **b) Inhibiteurs de corécepteurs**

Les inhibiteurs de corécepteurs sont de petites molécules qui, en se fixant au corecepteur, induisent des changements de conformation des boucles extracellulaires (mécanisme allostérique) dans la protéine prévenant l'attachement de la gp120 (Tableau 5).

Plusieurs inhibiteurs de CCR5 ont été testés au fil des années pour aboutir à la commercialisation du Maraviroc en 2007. Le maraviroc et autres inhibiteurs de CCR5 se lient à une poche hydrophobe transmembranaire du récepteur. L'utilisation du maraviroc fonctionne bien, toutefois des mécanismes de résistance sont connus. Le type de résistance le plus commun est l'émergence de virus X4 (Westby *et al.* 2006). Le 2<sup>ème</sup> mécanisme de résistance correspond au développement par le VIH de la capacité à utiliser le corécepteur dans sa forme liée au composé (Westby *et al.* 2007).

Les inhibiteurs de CXCR4, quant à eux, ont montré une efficacité limitée dans le traitement du VIH-1 due à une toxicité systémique, CXCR4 étant une molécule ubiquitaire (Tableau 5).

### **c) Inhibiteurs de fusion**

Les inhibiteurs de fusion ciblent la gp41, plus précisément la formation de la structure 6HB responsable de la fusion. L'enfuvirtide ou T20 fut le premier inhibiteur d'entrée approuvé, et est le seul inhibiteur de fusion présentement commercialisé. Cette molécule est un peptide de 36 acides aminés mimant le domaine HR-C de la gp41. Il se lie à la structure coiled-coil centrale composé des 3 HR-N et, de ce fait, empêche la formation du 6HB. Des mutations dans les régions HR-N induisant une résistance au T20 ont déjà été décrites. Le composé reste très efficace, mais le fait qu'il soit administré de façon injectable, reste un problème majeur d'adhérence au traitement par les patients. Une des solutions est le développement d'autres molécules ayant le même mécanisme d'action mais disponible oralement tels que les inhibiteurs D-peptides qui sont en cours d'essai cliniques (Tableau 5).

**Tableau 5. Les inhibiteurs d'entrée du VIH-1.**

| <b>Classe d'inhibiteur d'entrée</b>  | <b>Composé</b>       | <b>Statut de la recherche clinique</b>                             | <b>Références</b>  |
|--------------------------------------|----------------------|--|--|
| Inhibiteurs de l'attachement         | Pro 2000             | Aucune efficacité en phase III                                     | (Rusconi <i>et al.</i> 1996)                               |
|                                      | Carragard            | Aucune efficacité en phase III                                     | (Skoler-Karpoff <i>et al.</i> 2008)                        |
|                                      | Sulfate de cellulose | Aucune efficacité en phase III                                     | (Halpern <i>et al.</i> 2008; Van Damme <i>et al.</i> 2008) |
| Inhibiteur du site de liaison au CD4 | BMS-378806           | Développement préclinique  | (Lin <i>et al.</i> 2003)                                   |
| Molécule mimant le CD4               | CD4 soluble          | Aucune efficacité en phase I                                       | (Daar <i>et al.</i> 1990; Schacker <i>et al.</i> 1994)     |
| inhibiteurs d'expression de CD4      | Dérivés du CADA      | Développement préclinique  | (Vermeire <i>et al.</i> 2008)                              |
| Inhibiteurs de CCR5                  | Maraviroc            | Approuvé et commercialisé  | FDA (2009)   |
| Anticorps anti-CCR5                  | PRO 140              | Phase II   | (Jacobson <i>et al.</i> 2008)                              |
| Inhibiteurs de CXCR4                 | Plerixafor           | Approuvé pour la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques | (Flomenberg <i>et al.</i> 2010)                            |
| Inhibiteurs de fusion                | Enfuvirtide          | Approuvé et commercialisé  | (Wild <i>et al.</i> 1992)                                  |
|                                      | D-peptides           | Développement préclinique  | (Welch <i>et al.</i> 2007)                                 |

Tableau tiré de (Wilen *et al.* 2012)

#### 5.2.4. Antigénicité et immunogénicité de la gp120

L'enveloppe est la seule protéine virale exposée à la surface du virion; de ce fait, elle est la cible préférentielle de la réponse humorale de l'hôte tout au long de la maladie (Barin *et al.* 1985; Overbaugh and Morris 2012; Wyatt and Sodroski 1998). Étant la cible idéale des anticorps neutralisants (AcN), la gp120 et la gp41 sont la composante principale dans l'élaboration de vaccins expérimentaux anti-VIH-1 (Burton *et al.* 2004; Wyatt and Sodroski 1998). Toutefois, les efforts de vaccination avec l'enveloppe monomérique ou trimérique n'ont montré que peu d'efficacité (Koff 2012), bien que le vaccin RV-144 laisse entrevoir un espoir dans le domaine (Rerks-Ngarm *et al.* 2009).

La gp120 induit une réponse humorale robuste tout au long de la maladie. Toutefois, toutes les régions de la glycoprotéine ne sont pas antigéniques au même titre. C'est pourquoi elle a historiquement été subdivisée en 3 domaines ou faces, selon le type d'anticorps qu'elle élicite. On retrouve la face neutralisante, la face non-neutralisante et la face silencieuse (Poignard *et al.* 2001; Wyatt *et al.* 1998).

**La face neutralisante**, comme son nom l'indique, regroupe les régions de la gp120 qui sont la cible des AcN. Ces régions sont en général les domaines conservés de l'enveloppe dont l'attachement à un anticorps entraîne la neutralisation virale. Elle comprend les domaines fonctionnels tels que les sites de liaison au récepteur (CD4bs) et au corécepteur. Ces régions étant conservées entre les différentes souches, elles peuvent éliciter une réponse anticorps à large spectre chez certains individus (discuté plus loin) (Overbaugh and Morris 2012).

**La face non-neutralisante** est orientée vers l'intérieur du trimère, correspond à une partie du domaine interne et n'est visible que dans le contexte d'une gp120 monomérique libre. C'est un leurre pour le système immunitaire, la gp120 monomérique détournant la réponse immunitaire à son profit plutôt que vers les trimères fonctionnel. La réponse humorale élicitee contre cette région de l'enveloppe n'entraîne aucune neutralisation. Il s'agit là d'une forme d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte (Parren *et al.* 1997a).



**La face silencieuse**, quant à elle, est formée par le domaine externe fortement glycosylé, virtuellement invisible car caché par le manteau de glycans. Ce bouclier de glycans qui évolue rapidement forme une interférence stérique directe entre les anticorps et les déterminants neutralisants (Wei *et al.* 2003). En théorie, les glycans étant des molécules fabriquées par la cellule hôte devraient être considérés comme des molécules du soi et ne pas être la cible des AcN. Néanmoins, les sucres de la gp120 sont en grande partie riches en mannose, structure qui n'a pas été décrite chez les mammifère et qui est donc reconnue comme du non-soi (Lavine *et al.* 2012). On distingue notamment le 2G12, mentionné plus haut, AcN à large spectre qui reconnaît un groupement relativement bien conservé d'oligomannose glycans. (Calarese *et al.* 2003; Sanders *et al.* 2002).

### **5.2.5. La réponse anticorps à l'enveloppe au cours de la maladie**

Dès l'apparition d'une virémie détectable, les anticorps anti-Env apparaissent dans le sérum des patients. Cette réponse évolue au cours de la maladie avec le développement d'anticorps de différentes spécificités particulièrement au cours de la première année d'infection (Overbaugh and Morris 2012).

Aussi tôt que huit jours après la détection du virus plasmatique, on voit apparaître dans le plasma des complexes antigènes-anticorps, suivis dans la semaine qui suit par des anticorps anti-gp41 (Tomaras *et al.* 2008). La réponse anti-gp120 n'apparaît que 4 semaines après la virémie détectable et est principalement dirigée contre V3, qui est un épitope immunodominant. Cette réponse n'a toutefois pas d'effet détectable sur la virémie et ces anticorps sont considérés comme étant des anticorps non-neutralisants (Tomaras *et al.* 2008).

Des AcN contre la souche infectante (AcN autologues) n'apparaissent que plusieurs mois plus tard. Ces AcN autologues sont spécifiques de la souche infectante et sont incapable de neutraliser des virus hétérologues (Gray *et al.* 2007; Moore *et al.* 1994). Ils sont principalement dirigés contre les régions variables de la gp120 qui évoluent rapidement en réponse à cette pression sélective et échappent à la réponse immunitaire, notamment par des mécanismes de substitution, délétion et insertion d'acides aminés mais également par le remodelage du manteau de glycans (Bunnik *et al.* 2008). V1V2 est une cible majeure de cette

réponse d'AcN autologues survenant dans la première année d'infection (Bunnik *et al.* 2008; Rong *et al.* 2007).

Après plusieurs années de constante stimulation antigénique, des AcN à larges spectres apparaissent chez 30% des individus. Ces AcN sont capables de neutraliser un large éventail de virus hétérologues et de différents sous-types. Ces AcN à large spectre sont dirigés contre des régions plus conservées de la gp120. Contre le CD4bs, de nombreux AcN à large spectre ont été décrits tels que IgGb12 et VCR01 (Clapham and Lu 2011; Overbaugh and Morris 2012). Contre des épitope glycosidique conformationnels, le 2G12 mentionné plus haut (Trkola *et al.* 1996). Enfin, PG9/16 qui reconnaissent un épitope quaternaire constitué des parties constantes des régions variables V2 et V3 dans le contexte du trimère uniquement (Walker *et al.* 2009). Contre le site d'attachement du corécepteur, certains AcN tels que le 17b et le X5 ont été trouvés mais leur spectre de neutralisation n'est pas aussi large que ceux dirigés contre le site d'attachement de CD4 (Kwong *et al.* 1998; Moulard *et al.* 2002).

La gp41 est capable également d'éliciter une réponse à large spectre. Les AcN 2F5 et 4E10 interagissent avec une région de la gp41 adjacente au domaine MPER (membrane proximal external region) empêchant la formation de la structure 6HB responsable de la fusion (Muster *et al.* 1994; Stiegler *et al.* 2001).

## **6 Le tropisme du VIH-1**

### **6.1. Utilisation des corécepteurs et tropisme cellulaire**

#### **6.1.1. Classification du tropisme**

Dès le début de l'épidémie, la propriété du VIH-1 à former des syncytia, cellules géantes multinucléées résultant de la fusion des lignées cellulaire T exprimant CD4, (Lifson *et al.* 1986) a été identifiée et associée aux isolats provenant de patients en stade SIDA (Tersmette *et*

*al.* 1988). La grande majorité des souches issues de sujets asymptomatiques étaient incapables de former des syncytia, en fait incapables de réplication dans ces lignées T (Tersmette *et al.* 1988). Les termes de souches SI pour syncytium-inducing et NSI pour non-syncytium-inducing sont alors été adoptés. Cette classification est basée sur la capacité des isolats à se répliquer et à former des syncytia dans les lignée cellules T telles que les cellules H9, MT-2 ou encore MT-4. À ce titre, les cellules MT-2 furent utilisées comme test phénotypique classifiant les isolats en SI ou NSI (Harada *et al.* 1985; Koot *et al.* 1992). Le développement de méthodes permettant de différencier les monocytes du sang en macrophages susceptibles au VIH-1 permit la classification des souches NSI, capables de réplication dans ces macrophages, en souches M-tropiques pour macrophage-tropiques. Toutefois, ces souches NSI/M-tropiques bien qu'incapables de réplication dans les lignées cellulaires T, sont capables d'infecter les cellules T primaires. Par opposition, les souches SI ont alors été appelées T-tropiques (Schwartz *et al.* 1989).

Ce n'est que plus tard, avec la découverte des corécepteurs du VIH-1 que l'on pu associer les isolats NSI/M-tropique à l'utilisation de CCR5 et les SI/T-tropique à l'utilisation de CXCR4. Les virus utilisant CCR5 sont appelés virus R5, ceux utilisant CXCR4 sont appelés X4 et les virus pouvant infecter la cellule cible en utilisant les 2 corécepteurs sont appelés R5X4 ou *dual-mixed* (DM) (Berger *et al.* 1998) (Figure 15).

Les virus X4 sont considérés comme plus virulents car ayant une capacité répliquative *in vitro* plus grande que les virus R5 et étant associés au rapide déclin des LTCD4 ainsi qu'à la progression rapide de la maladie vers le stade SIDA (Asjo *et al.* 1986; Connor *et al.* 1997; Richman and Bozzette 1994; van 't Wout *et al.* 1998).


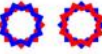




### **6.1.2. Les cibles cellulaires et relevance pathologique**

CCR5 et CXCR4 sont tous deux exprimés, sur les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires, les macrophages et les cellules dendritiques. Toutefois, 90% des cellules T CD4<sup>+</sup>, incluant les cellules T naïves, mémoires, les thymocytes et les précurseurs T, expriment CXCR4 tandis que l'expression de CCR5 est cantonnée à une sous-catégorie plus restreinte des cellules T qui sont les cellules T

mémoires et activées représentant 15-35% du pool de cellules T (Schuitemaker *et al.* 2011) (figure 15). Les cellules T naïves étant la cible exclusive des virus X4, les conséquences pathologiques de l'infection de ces cellules peuvent être dramatiques, résultant en la déplétion du plus large pool de cellules CD4 dans le corps notamment à la source qu'est le thymus. Ainsi, les virus X4 sont considérés comme plus virulents que les virus R5 car associés à une déplétion rapide et massive des cellules T CD4<sup>+</sup> (Blaak *et al.* 2000). Un site important pour la réplication virale est le thymus, l'organe majeur de la production des cellules T naïves, où 60-70% des cellules T expriment CXCR4 tandis que CCR5 est marginalement exprimé (<5%) (Zamarchi *et al.* 2002).

D'un autre côté, CCR5 est très largement exprimé par les cellules mononucléées du tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT gut-associated lymphoid tissue). Le GALT, qui est le plus grand organe lymphoïde du corps humain, contient la moitié des lymphocytes T de l'organisme. Ces lymphocytes sont plus activés que ceux du sang périphérique car ils constituent la première ligne de défense face aux microorganismes associés à la nourriture. La majorité des LTCD4<sup>+</sup> du GALT expriment CCR5 et ont de faibles niveaux d'expression de CXCR4 (Poles *et al.* 2001; Veazey *et al.* 2000). Ceci contribue à la destruction massive des cellules CD4 et ce, dès la phase aiguë de l'infection. (Brenchley and Douek 2008; Brenchley *et al.* 2004; Kotler *et al.* 1984) Le pool de cellules perdues lors de la déplétion massive des LTCD4<sup>+</sup> du GALT en primo infection n'est jamais reconstitué en totalité durant toute la durée de la maladie, ce qui est une caractéristique de l'infection à VIH.

La destruction sélective des LTCD4<sup>+</sup> mémoires durant l'infection primaire est un événement dynamique continué forçant l'organisme à renouveler et remplacer ces cellules (Mattapallil *et al.* 2005)

| Corécepteur           | CCR5  | CCR5 et CXCR4  | CXCR4   |
|-----------------------|---|--|---|
| <b>Phénotype</b>      |   |  |   |
| MT-2                  | NSI   | SI   | SI  |
| Trofile               | R5  | Dual/mixed   | X4  |
| Clone                 |  |   |  |
| Isolat                |  |  |  |
| <b>Tropisme</b>       |   |  |   |
| LTCD4 <sup>+</sup>    | Mémoires et activées  | Naïves et mémoires   | Naïves et mémoires  |
| Thymocytes            | -   | ++   | +++   |
| Précurseurs           | -   | ++   | +++   |
| Macrophages           | +++   | +  | +/-   |
| Cellules dendritiques | +++   | +  | +/-   |
| Lignées T             | -   | ++   | +++   |

**Figure 15. Relation entre utilisation des corécepteurs, phénotype et tropisme du VIH-1.**

Tiré de (Schuitemaker *et al.* 2011) Le tropisme des virus est basé sur l'expression des corécepteurs à la surface des cellules cibles ainsi que sur les propriétés biologiques de l'enveloppe. Le trofile est un test phénotypique *in vitro* qui sera discuté plus loin.

### 6.1.3. Corécepteurs alternatifs

CCR5 et CXCR4 ne sont pas les seuls récepteurs cellulaires utilisés par le VIH-1 comme corécepteur d'entrée. De nombreux récepteurs de chimiokines ainsi que des récepteurs orphelins montrent une activité de corécepteur *in vitro* bien que leur rôle physiologique ne soit pas avéré. Les récepteurs de chimiokines CCR2b (Doranz *et al.* 1996), CCR3 (He *et al.* 1997), CCR8 (Lee *et al.* 2000), CXCR6 (STLR33/Bonzo)(Liao *et al.* 1997) et CX3CR1 (Combadiere *et al.* 1998) ; le récepteur Apj (Choe *et al.* 1998) (récepteur de l'apeline), BLTR (récepteur du Leukotriene B4), US28 (Pleskoff *et al.* 1997); ainsi que les récepteurs orphelins GPR15/BOB, GPR1 (Edinger *et al.* 1998), ChemR23, RDC1 ont tous été identifiés comme corécepteurs d'entrée du VIH-1 *in vitro* (revue par Heveker (Heveker 2001)). Parmi ceux-ci seuls CCR8 et

CCR3 ont une possible implication *in vivo* correspondant à l'infection des thymocytes dans le premier cas (Lee *et al.* 2000) et l'infection de la microglie dans le cas de CCR3 (He *et al.* 1997). L'importance biologique de ces corécepteurs alternatifs reste incertaine *in vivo* car, les inhibiteurs d'entrée spécifiques de CCR5 et CXCR4 peuvent totalement inhiber la réplication de plusieurs souches de VIH-1 qui ont un large spectre d'utilisation des corécepteurs (Zhang and Moore 1999)

## **6.2. Le switch du tropisme**

Chez une fraction d'individus, variable selon le sous-type du virus infectant, le tropisme du VIH-1 évolue de l'utilisation de CCR5 dans les stades précoces de l'infection, vers l'utilisation de CXCR4 dans les stades plus tardifs (Schuitemaker *et al.* 1992). Les virus R5 existent généralement tout au long de la maladie tandis que les virus X4 n'apparaissent que plus tard dans l'infection et prédominent au stade SIDA. Cette évolution de tropisme de R5 vers X4 est appelée « switch ». Ce switch d'utilisation des corécepteurs est associé à un rapide déclin des LTCD4<sup>+</sup> et à une accélération de la maladie vers le stade SIDA. (Connor *et al.* 1997; Richman and Bozzette 1994).

### **6.2.1. Transmission et primo-infection, l'importance de CCR5**

Le CCR5 s'avère être le corécepteur principal du VIH, quasi-indispensable à l'établissement de l'infection. En effet, l'absence d'un CCR5 fonctionnel chez certains individus les rend résistants à l'infection. L'allèle *ccr5Δ32*, correspondant à une délétion de 32 paires de base dans la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire de CCR5, produit une protéine non fonctionnelle et non exprimée à la surface des cellules (Liu *et al.* 1996). Les individus homozygotes pour *ccr5Δ32* (1% des caucasiens) présentent une résistance à l'infection tandis que les hétérozygotes (10% des caucasiens) montrent une évolution ralentie de la maladie (Huang *et al.* 1996; Liu *et al.* 1996). Une autre mutation, m303, introduisant un codon stop dans le gène de CCR5, a également été identifiée chez des individus exposés mais non-infectés (Quillent *et al.* 1998). Ces évidences laissent penser que seuls les virus R5 peuvent être transmis d'autant plus qu'ils prédominent très largement durant la phase aigüe de l'infection (Keele *et al.* 2008). C'est le

cas même si des virus X4 sont détectés chez le donneur (Long *et al.* 2002; Zhu *et al.* 1993). Cependant, les virus X4 peuvent être transmis dans de très rares cas, quelques cas ont été notamment décrits chez des sujets homozygotes *ccr5Δ32* (Sheppard *et al.* 2002). La transmission verticale de virus X4 et R5X4 a également été décrite chez 5 enfants ougandais (Huang *et al.* 2009)

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer cette barrière à la transmission/primo infection des virus X4.

**La barrière mucoale :** Les virus X4 ne passeraient pas la barrière mucoale à cause de plusieurs facteurs. Il a été montré que la mucine et les protéines antivirales innée présentes dans le tractus génital sont capables d'emprisonner et d'inactiver spécifiquement les virus X4. De plus les cellules résidentes de l'épithélium montrent une amplification préférentielle des virus R5 (Margolis and Shattock 2006).

**Le comportement sexuel :** Il est aussi à noter que les virus X4 étant présents chez les individus en stade très tardifs de la maladie, les comportements sexuels à risques sont beaucoup moins fréquents chez ce type de patients (Dukers *et al.* 2001; Schuitemaker *et al.* 2011).

**Les cellules cibles :** Une autre contribution potentielle à la prédominance marquée des variants R5 en phase aigue serait un biais d'amplification. Dans le sang périphérique une grande proportion de LTCD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> (mémoires et activées) est recrutée durant l'infection à VIH, fournissant une large cible de réplication des virus R5 qui surpasseront la réplication des virus X4. D'autre part, la forte proportion de cellules CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> du GALT considéré comme le site majeur de réplication du VIH-1 en primo-infection, fournirait un environnement optimal à l'amplification préférentielle des virus R5 (Brenchley and Douek 2008; Brenchley *et al.* 2004).

**La réponse immunitaire :** Il est également possible que les virus X4 soient généralement mieux reconnus par le système immunitaire et peuvent donc se répliquer uniquement après la détérioration de celui-ci (Regoes and Bonhoeffer 2005) (Figure 16).

### **6.2.2. Phase chronique, émergence graduelle des virus X4**

Dans les stades précoces de la phase chronique et durant la phase asymptomatique, on observe une population R5 homogène capable de se répliquer efficacement dans les cellules T et les macrophages (van't Wout *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1993). Au fil du temps le virus passe graduellement d'un tropisme exclusivement R5 à un tropisme X4 en passant par un tropisme mixte R5X4 considéré comme une étape intermédiaire (Bunnik *et al.* 2011). L'évolution du tropisme R5 vers X4 consiste en un élargissement du spectre d'utilisation des corécepteurs, ce qui est observé également au niveau clonal. En effet, le switch s'accompagne souvent d'une utilisation de corécepteurs alternatifs dans les étapes intermédiaires (Scarlatti *et al.* 1997). De plus, parmi les clones dual-tropiques, on distingue les virus dual-R et dual-X utilisant plus efficacement CCR5 ou CXCR4 respectivement, mais également des virus dual (R5X4) utilisant les deux corécepteurs avec une efficacité similaire (Huang *et al.* 2007b; Irlbeck *et al.* 2008; Yi *et al.* 1999). Le cheminement intuitif du switch étant R5 → dual-R → dual-X → X4 (Bunnik *et al.* 2011) (Figure 16). Ces virus capables d'utiliser CXCR4 apparaissent durant la phase asymptomatique et précèdent le stade SIDA (Koot *et al.* 1999).

Néanmoins, l'accumulation des mutations dans ENV nécessaires au switch a un coût au niveau de la capacité répliquative ou « fitness » du virus. En effet, il a été montré que les virus dual-tropiques ont une capacité répliquative diminuée par rapport aux variants principaux et majoritaires R5 et X4 (Bunnik *et al.* 2011; Pastore *et al.* 2004).

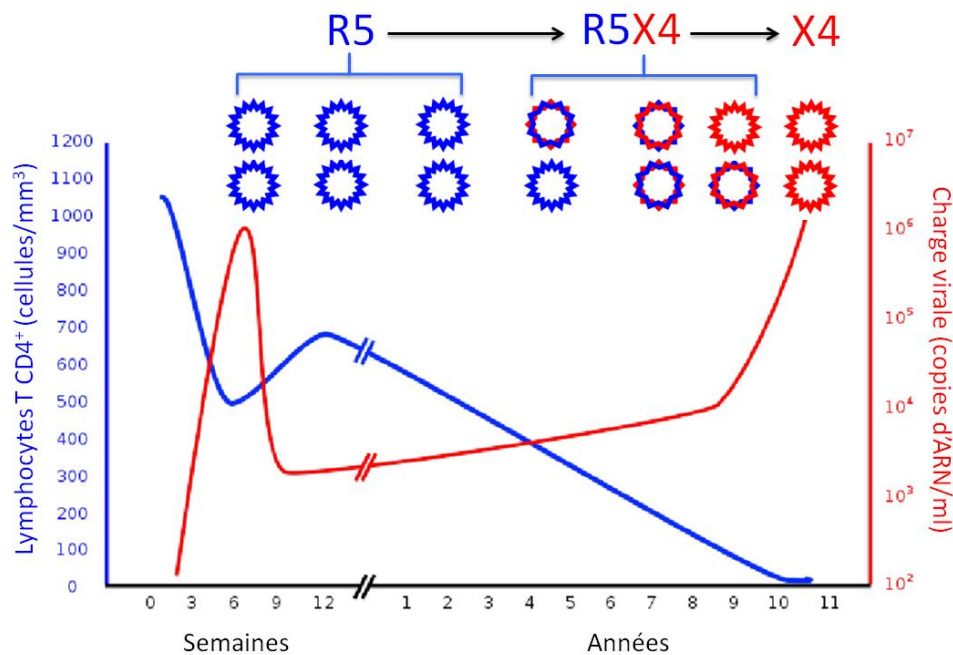
### **6.2.3. Le stade SIDA, la prédominance des virus X4**

Une fois établis, les variant utilisant CXCR4 auraient un avantage répliquatif sur les variants R5 de part leur plus grande capacité répliquative *in vitro* et de leur plus large éventail de cellules cibles (Asjo *et al.* 1986; Connor *et al.* 1993; van 't Wout *et al.* 1998).



L'apparition des virus X4 s'accompagne invariablement d'une augmentation de la vitesse de déplétion des LTCD4 et de l'accélération de la maladie représentée par l'effondrement du système immunitaire, le stade SIDA, aboutissant à terme de la mort du patient (Koot *et al.* 1993; Quillent *et al.* 1998). Toutefois, il n'est toujours pas clair si l'apparition des virus X4 est une cause ou une conséquence de l'épuisement du système immunitaire.

Bien que les variants X4 soient largement prédominants à ce stade, les variants R5 coexistent chez la vaste majorité des patients jusqu'à la fin de la maladie. (Koot *et al.* 1996; Schuitemaker *et al.* 1992). Une population virale purement X4 n'est que très rarement détectée chez les sujets infectés (Melby *et al.* 2006) (Figure 16).



**Figure 16. Évolution du tropisme au cours de la maladie.**

Au début de l'infection les virus R5 prédominent (bleu). Au fur et à mesure le virus acquiert la capacité d'utiliser le corécepteur CXCR4, virus R5X4 (bleu/rouge), peu avant l'établissement du stade SIDA,

#### 6.2.4. Le switch chez les différents sous-types

Le switch intervient à différentes fréquences chez les différents sous-types du VIH-1. En effet, chez le sous-type B, le plus largement étudié, les virus X4 émergent chez approximativement 50% des individus, l'autre moitié restant R5 jusqu'à la fin de la maladie (Abebe *et al.* 1999; Bratt *et al.* 1998; Cilliers *et al.* 2003; Coetzer *et al.* 2006; Kaleebu *et al.* 2007; Yu *et al.* 1995). Les sous-types A et D montrent une utilisation de CXCR4 beaucoup plus fréquente que le sous-type B. Le sous-type C montre une utilisation de CXCR4 beaucoup moins fréquente que les premiers représentant 30% des souches aujourd'hui (Connell *et al.* 2008).

Les hypothèses pour cette moins grande fréquence de virus X4 chez le sous-type C sont que l'enveloppe du sous-type C a des contraintes structurales qui limitent l'évolution des virus de R5 vers X4.

#### 6.2.5. Les diverses hypothèses pouvant expliquer le switch

L'apparition et la prédominance des virus X4 dans les stades tardifs de l'infection à VIH-1 est l'objet de débats depuis des années. Néanmoins, l'explication biologique de ce phénomène reste encore non-élucidé. Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer le switch au cours de la maladie (Regoes and Bonhoeffer 2005).

**L'hypothèse de transmission-mutation** suggère que les virus R5 sont préférentiellement transmis et mutent de façon graduelle en virus X4. L'apparition des virus X4 serait donc le fruit du hasard, ce qui ne cadre pas avec les fréquences et le « timing » d'apparition des variants X4 chez les individus (De Jong *et al.* 1992; Fouchier *et al.* 1992).

**L'hypothèse du contrôle immunitaire** suggère que les virus X4 sont préférentiellement reconnus par le système immunitaire et subséquemment supprimés par celui-ci. Les virus X4 émergeraient conséquemment à la dégradation graduelle du système immunitaire. En accord avec cette hypothèse, Harouse *et al.* ont montré en 2003 que les macaques rhésus coinfecteds avec des virus SHIV (virus de l'immunodéficience hybride simien-humien) R5 et X4 montrent

une augmentation de la population X4 et un déclin de la population R5 après déplétion des LT CD8<sup>+</sup> (Harouse *et al.* 2003). De nombreuses autres évidences montrent que les virus X4 sont plus sensibles à la réponse anticorps que les virus R5 (Bou-Habib *et al.* 1994; Bunnik *et al.* 2007; Zhuang *et al.* 2011). Toutefois, Le groupe de Cheng-Mayer a montré que la déplétion des cellules B chez le macaque n'affectait en rien le tropisme du virus et n'entraînait pas l'émergence de virus X4. Ceci suggèrerait que le switch de tropisme dépend uniquement de la réponse à médiation cellulaire et non de la réponse humorale (Tasca *et al.* 2011).

**L'hypothèse des cellules cibles** met l'emphasis sur le shift graduel de la disponibilité des cellules exprimant CCR5 et CXCR4. En effet l'épuisement des cellules T CD4<sup>+</sup> au cours de l'infection induit un « turn-over » accru des cellules T-naïves qui sont mises en circulation pour garder l'homéostasie des cellules T (Hazenberg *et al.* 2000).

Aucune de ces hypothèses n'explique à elle seule le switch d'une façon entièrement satisfaisante. Il se peut que le changement d'utilisation de corécepteur résulte d'une combinaison des ces différents mécanismes.

#### **6.2.6. L'absence de switch**

Il reste qu'une fraction non négligeable des patients ne montre pas de switch d'utilisation des corécepteurs au cours de leur maladie. Chez ces individus, on observe toutefois une évolution de l'utilisation de CCR5. Les variants R5 des stades tardifs sont caractérisés par une réplication rapide, une cytopathycité accrue et une utilisation de CCR5 plus efficace (Jansson *et al.* 1999; Koning *et al.* 2003; Repits *et al.* 2005).

### **6.3. Les déterminants moléculaires du tropisme**

La boucle V3 porte les principaux déterminants du tropisme. Les mutations retrouvées dans V3 peuvent à elle seules prédire le tropisme du virus. Toutefois des mutations retrouvées dans d'autres régions de l'enveloppe peuvent également influencer le tropisme en conjonction avec des changements dans V3 Ce rôle central de la boucle V3 est universel et se retrouve chez

toutes les clades du VIH-1 (Coetzer *et al.* 2006; Raymond *et al.* 2010b; Singh *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2010b) . En particulier, des acides aminés chargés positivement aux positions 11 et/ou 25 de la boucle sont fortement associés à l'utilisation de CXCR4 (De Jong *et al.* 1992; Fouchier *et al.* 1992). Plus largement une augmentation de la charge nette de V3 accompagne le switch d'utilisation des corécepteurs (Fouchier *et al.* 1992). Ceci est expliqué par la charge globalement négative des boucles extracellulaires de CXCR4 par rapport à celles de CCR5 qui sont plutôt positivement chargées (Hartley *et al.* 2005). Finalement, la perte du site de N-glycosylation en position 6 est associée au tropisme X4 (Pollakis *et al.* 2001). Néanmoins, il existe de nombreuses autres mutations dans V3 associées à l'utilisation CXCR4 ou CCR5, mutations ayant été intégrées dans les algorithmes de prédiction du tropisme du virus (voir plus bas).

La deuxième région influençant le tropisme est la boucle V2 dans laquelle de nombreuses mutations ainsi que la longueur de la boucle ont été associées à l'utilisation de CXCR4, bien que cette influence soit moins marquée que pour V3 (Fouchier *et al.* 1995; Groenink *et al.* 1993; Hoffman *et al.* 2002; Jansson *et al.* 2001; Pastore *et al.* 2006; Thielen *et al.* 2010).

V1 (Boyd *et al.* 1993) mais surtout V1V2 en tant que boucle influencerait le tropisme notamment par son nombre de sites de N-glycosylations permettant de compenser la perte de fitness associée au switch (Labrosse *et al.* 2001; Ogert *et al.* 2001; Pastore *et al.* 2006). De plus, des changements dans C2 (Pastore *et al.* 2006; Pastore *et al.* 2004), V4 (Dunfee *et al.* 2007), C4 (Carrillo and Ratner 1996) et même dans la gp41 (Huang *et al.* 2008; Pastore *et al.* 2004) influencent également l'utilisation des corécepteurs.

#### **6.4. Les outils de détermination du tropisme**

À l'heure des inhibiteurs d'entrée, il devient essentiel de pouvoir tester l'utilisation des corécepteurs par le virus des patients étant donné les risques d'émergence de virus X4 lors de la prise d'inhibiteurs de CCR5.

La présence ou l'absence de virus utilisant CXCR4 chez les individus infectés peut être investiguée par des méthodes de phénotypage tels que le test MT-2 (Japour *et al.* 1993; Koot *et al.* 1992) basé sur les PBMC ou encore le test Trofile (Coakley *et al.* 2009; Whitcomb *et al.* 2007) (Monogram) basé sur le plasma. De plus les méthodes de détection basées sur le génotype de la séquence de V3 ont aussi été développées.

#### **6.4.1. Les tests phénotypiques**

Les tests phénotypiques consistent en l'évaluation de l'infection de cellules indicatrices exprimant CD4 et un corécepteur par les virus dérivés des patients. (Raymond *et al.* 2012).

##### **a) Test de virus dérivés des PBMC**

La première méthode consiste en le test direct des virus produits par les PBMC des patients soit par co-culture avec les cellules indicatrices, soit par amplification préalable des virus des PBMC.

Le premier test du genre appelé test MT-2, est le tout premier test phénotypique à avoir été développé. Les cellules indicatrices, MT-2, lignée cellulaire lymphoblastoïde transformée par HTLV-1 (human T-cell leukaemia virus type 1) exprime CXCR4. Ce test permet de distinguer les virus SI des virus NSI en observant la formation de syncytia (Karlsson *et al.* 1994) (Tableau 6).

Après la découverte des corécepteurs, d'autres tests plus précis ont été développés utilisant des cellules indicatrices U87 (Gonzalez-Serna *et al.* 2010) ou GHOST (Cecilia *et al.* 1998) transfectées avec CCR5, CXCR4 ou d'autres corécepteurs. Ces derniers permettant également de tester l'utilisation de corécepteurs alternatifs par le virus.

## **b) Test de virus recombinants**

Une deuxième méthode consiste en la production de virus recombinants infectieux exprimant l'enveloppe au complet ou partielle des virus des patients. Ces tests ont été développés dans le but d'éviter la sélection des virus dus aux passages successifs *in vitro*.

Le test le plus utilisé à ce jour, et qui reste une référence notamment dans le domaine du diagnostique des patients, est le test Trofile commercialisé par Monogram Bioscience. Il consiste en la production d'un virus recombinant exprimant l'enveloppe des virus des patients, amplifiée par RT-PCR à partir du plasma. Le virus recombinant ainsi produit est alors testé sur des cellules exprimant CCR5 ou CXCR4. L'activité luciférase permet ensuite de déterminer le tropisme du virus (Whitcomb *et al.* 2007) (Tableau 6).

Les études cliniques sur les antagonistes de CCR5 ont été réalisées avec la détermination du tropisme par Trofile. Le seuil de sensibilité du test original (original Trofile assay OTA) a ensuite été augmenté dans le nouveau test appelé ESTA (enhanced sensitivity trofile assay). En effet, le test OTA est capable de détecter des variants minoritaires présents à hauteur de 10% dans la quasiespèce ; ce dernier permet ainsi de détecter des variants représentant 0,3% de la quasiespèce (Su *et al.* 2009).

Deux autres tests utilisant des virus recombinants avec quelques différences techniques ont été développés également, il s'agit du test de tropisme de Toulouse (TTT) (Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France) (Raymond *et al.* 2010a) et du test espagnol (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain) (Gonzalez *et al.* 2010).

Alors que la sensibilité du test Trofile pour la détection de virus utilisant CXCR4 est similaire à celle du test MT2 (Coakley *et al.* 2009), les tests phénotypiques recombinants sont capables de distinguer les populations pures R5, DM et pures X4.

**Tableau 6. Tests phénotypiques utilisés pour la détermination du tropisme du VIH-1**

|                              | <b>MT-2</b>                                | <b>Trofile ESTA</b>  |
|------------------------------|--|--|
| <b>Insert</b>                | aucun                                      | gp160 du sujet   |
| <b>Construction</b>          | aucune                                     | Vecteur d'expression de ENV<br>Vecteur génomique VIH Gag-Pol-<br>Luc |
| <b>Cellules productrices</b> | PBMC                                       | HEK293   |
| <b>Cellules cibles</b>       | MT-2                                       | U87.CD4.CCR5<br>U87.CD4.CXCR4  |
| <b>Détection</b>             | Formation de syncytia,<br>p24, activité RT | Activité luciférase  |
| <b>Sensibilité</b>           | Non-déterminée                             | 0.3%   |
| <b>Temps</b>                 | 2-5 semaines                               | 16 jours   |

#### **6.4.2. Les tests génotypiques : les algorithmes de prédiction**

L'identification d'une corrélation entre des changements d'acides aminés et l'usage des différents corécepteurs a mené au développement d'algorithmes de prédiction de l'utilisation des corécepteurs. Commenant par la règle 11/25 (Fouchier *et al.* 1992), les efforts se sont d'abord concentrés sur l'identification de motifs dans V3 associés à la prédiction du tropisme.

##### **c) Méthode**

Afin de corréliser une séquence en acides aminés à un tropisme, ces algorithmes utilisent des méthodes de calculs statistiques très variées telle que les machines à vecteur de support ou SVM (support vector machine), les réseaux de neurones artificiels (Neural Network), les matrices de score position-spécifique ou PSSM (position-specific scoring matrix), ou encore les forêts d'arbres décisionnels (random forest).

La plupart de ces prédicteurs génotypiques incorporent des informations de la région V3 (Boisvert *et al.* 2008; Jensen *et al.* 2003; Resch *et al.* 2001; Xu *et al.* 2007). Cependant dans certains cas, ces algorithmes intègrent aussi des corrélats génotypiques des autres régions de l'enveloppe (Hoffman *et al.* 2002; Thielen *et al.* 2010). Certaines méthodes utilisent également des données cliniques (Sing *et al.* 2007), ainsi que des informations structurales (Sander *et al.* 2007), afin d'améliorer les prédictions et de mieux discriminer les séquences X4 des R5X4 (Lamers *et al.* 2008).

#### **d) Les algorithmes phares**

Pour l'instant, les algorithmes les plus largement utilisés sont WebPSSM (Jensen *et al.* 2003) et Geno2pheno<sub>[coreceptor]</sub> (Lengauer *et al.* 2007) qui sont tous deux basés sur la séquence de V3. WebPSSM ou PSSM, comme son nom l'indique, utilise la méthode PSSM qui analyse les séquences en acides-aminés de la boucle V3. Il calcule pour chaque position d'acide aminés, la probabilité que la séquence soit dérivée d'un virus X4. PSSM fournit donc un score pour une séquence donnée; un score élevé dénote une forte probabilité d'appartenir à un virus X4. Deux algorithmes PSSM ont été développés, le premier PSSM<sub>X4R5</sub> (Jensen *et al.* 2003), entraîné sur des séquences de sous-type B prédit un tropisme X4 ou R5, et PSSM<sub>SINSI</sub> spécifique des séquences de sous-type C (Jensen *et al.* 2006), prédit la probabilité qu'une séquence soit SI ou NSI.

Geno2pheno<sub>[coreceptor]</sub> basé sur la méthode de calcul SVM, fournit un résultat sous forme de taux de faux positif ou FPR (false positive rate) indiquant la probabilité qu'une séquence R5 soit faussement classifiée en X4. Différents seuils de FPR peuvent être utilisés pour la prédiction modifiant la sensibilité et spécificité de la prédiction. La flexibilité de SVM permet d'incorporer des données supplémentaires telles que le nadir CD4, la charge virale et le compte CD8 (Lengauer *et al.* 2007).

#### **e) Performance**

La spécificité et sensibilité des algorithmes dépendent des méthodes de production des séquences et aussi des sous-types du virus. Sur les virus clonés du sous-type B, la spécificité et



sensibilité de la plupart des algorithmes excèdent 90% et 80% respectivement. Toutefois, la sensibilité tombe à 50% pour des virus non-B et en utilisant un séquençage « bulk », c'est à dire un séquençage directement sur les produits de PCR (Garrido *et al.* 2008).

#### f) Utilisation en clinique

Geno2pheno<sub>[coreceptor]</sub> et PSSM ont tous deux montré une bonne valeur prédictive quant à la réponse au traitement avec le maraviroc chez les patients. Toutefois de nombreuses évidences supportent la préférence de geno2pheno<sub>[coreceptor]</sub> pour la clinique (Harrigan and Geretti 2011) Le test phénotypique Trofile approuvé pour la clinique est extrêmement couteux. Les tests génotypiques seraient ainsi une alternative envisageable pour les praticiens, bien que des efforts restent à faire afin d'en améliorer les performances.

## 7 La transmission mère-enfant du VIH

### 7.1. Historique

Au début des années 80, quelques équipes suggèrent une possible transmission d'un agent vecteur du syndrome d'immunodéficience humaine de la mère à l'enfant (Cowan *et al.* 1984), mais c'est en 1985, à l'hôpital Sainte-Justine que le Dr Normand Lapointe et son équipe confirment pour la première fois la transmission *in utero* du virus alors appelé HTLVIII (Lapointe *et al.* 1985).

### 7.2. Modes de transmission

On sait désormais que le VIH peut être transmis *antepartum*, par passage transplacentaire (Lapointe *et al.* 1985; Sprecher *et al.* 1986), *intrapartum* durant le travail et l'accouchement (Mundy *et al.* 1987), ainsi que *postpartum* via le lait maternel (Thiry *et al.* 1985). En Europe et en Amérique du Nord, une femme séropositive non traitée à 15 à 25% de risques de transmettre l'infection à son enfant, tandis que dans les pays endémiques (Afrique et Asie) ce taux de transmission passe à 25-40% (1995; De Cock *et al.* 2000). Ces disparités s'expliquent essentiellement par les différences de fréquence et de durée d'allaitement au sein observées

entre les femmes des pays développés et celles des pays aux ressources limitées mais pourraient également s'expliquer par une plus forte prévalence dans les pays en développement de tous types de coïnfections favorisant la TME.

La barrière foeto-placentaire est une barrière efficace contre le passage du virus. La transmission in utero a lieu principalement à la fin de la grossesse lorsque les brèches qui apparaissent au niveau du placenta permettent le passage de cellules maternelles infectées (Ransy *et al.* 2007). La transmission via le lait maternel représente la moitié de la TME du VIH-1 et est fonction de la durée de l'allaitement (Koulinska *et al.* 2006).

### **7.3. Facteurs de risque de la transmission périnatale**

De nombreux facteurs sont positivement corrélés à la transmission périnatale du VIH-1 et sont souvent considérés comme des facteurs prédictifs des risques de transmission. Ces facteurs peuvent être d'origine maternelle, virale ou fœtale et permettent d'adapter la prophylaxie antirétrovirale de façon individuelle.

Le contrôle de l'infection est globalement un facteur prédictif de la TME. En effet, une charge virale élevée de la mère et un faible décompte de cellules CD4<sup>+</sup>, deux facteurs associés à un état avancé de la maladie, sont les 2 premiers facteurs associés à la TME du VIH-1 (Delicio *et al.* 2011; Newell *et al.* 1996; Ransy *et al.* 2007; Thomas *et al.* 1994). De plus, les mères présentant une réponse T cytotoxique ainsi qu'une réponse humorale robuste ont un risque diminué de transmission du virus à l'enfant (Barin *et al.* 2006; Jin *et al.* 1998). Enfin, des facteurs génétiques associés à la réponse immunitaire, notamment la présence de l'allèle HLA-DR13, ainsi que la discordance entre les HLA de classe I de la mère et du fœtus protégeraient ce dernier contre la TME du VIH-1 (MacDonald *et al.* 1998; Matt and Roger 2001).

En outre, toute condition pro-inflammatoire comme les infections - en particulier la coïnfection avec le virus de l'hépatite C (VHC) très fréquente chez les individus VIH<sup>+</sup> - toute procédures obstétrique invasive, l'accouchement vaginal ou prématuré, le comportement à

risque de la mère (abus de drogues), ainsi que l’allaitement sont autant de facteurs de risque qui viennent s’ajouter aux premiers (Delicio *et al.* 2011; Goldenberg *et al.* 1998; Hershow *et al.* 1997; Ransy *et al.* 2007; Willumsen *et al.* 2000).

#### 7.4. Prévention de la TME (PTME)

Au début des années 90, les taux de transmission du VIH-1 étaient d’environ 15 à 25% dans les pays développés, ces chiffres ont considérablement diminué pour atteindre moins de 2% aujourd’hui grâce à l’utilisation de la prophylaxie antirétrovirale (antepartum, intrapartum et postpartum), à la pratique de la césarienne programmée avant le début du travail et à l’allaitement artificiel (Ransy *et al.* 2007) (tableau 7).

**Tableau 7. Évolution de la prophylaxie antirétrovirale à des fins de PTME**

|                                     | Année (étude)*      | Mère                                   | Enfant          | Transmission |
|-------------------------------------|---------------------|--|-----------------|--------------|
| <b>Pays développés</b>              | 1990                | AZT <i>antepartum</i>                  | -               | 25%          |
|                                     | 1994 (PACTG 076)    | AZT<br><i>antepartum/intrapartum</i>   | AZT             | 8,3%         |
|                                     | <b>Actuellement</b> | HAART<br><i>antepartum/intrapartum</i> | HAART           | <2%          |
| <b>Pays aux ressources limitées</b> | 1999 (HIVNET 012)   | NVP dose unique<br><i>intrapartum</i>  | NVP dose unique | 8,2%         |
|                                     | 2004 (PHPT2)        | AZT<br><i>antepartum/intrapartum</i>   | NVP dose unique | 1,9%         |
|                                     |                     | NVP dose unique<br><i>intrapartum</i>  |                 |              |

\*Études : PACTG 076 (Connor *et al.* 1994), HIVNET 012 (Guay *et al.* 1999), PHPT2 (Lallemant *et al.* 2004)

Le traitement des nouveaux nés dès les premières heures de vie s'avère efficace avec le maintien de la charge à des taux indétectables correspondant dans certains cas à une guérison fonctionnelle.

## **8 La grossesse et l'immunité maternelle**

### **8.1. La gestation**

#### **8.1.1. Déroulement de la grossesse**

La gestation ou grossesse se déroule en moyenne sur 40 semaines - de l'initiation (fécondation et nidation) à l'accouchement - divisées en 3 trimestres correspondant aux différentes étapes de développement fœtal. Le premier trimestre (semaines 1 à 13) correspond à la fécondation, l'implantation et au développement embryonnaire aboutissant à la formation de tous les organes vitaux. Au cours du deuxième trimestre (semaines 14 à 27) l'embryon, devenu fœtus, est mature et grandit avec formation et allongement d'autres organes tels que la peau et les os. À l'issue de ce 2<sup>ième</sup> trimestre le fœtus est viable. Le troisième trimestre (semaines 28 à 40) consiste principalement à la prise de poids finale (Nguyen and Wilcox 2005).

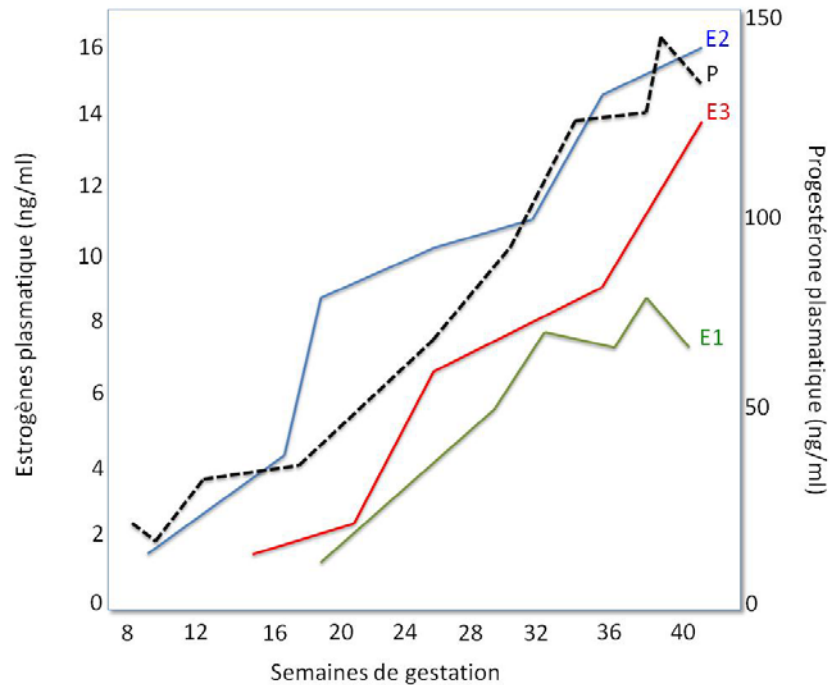
#### **8.1.2. Les hormones stéroïdiennes**

De nombreux changements physiologiques maternels sont nécessaires à l'établissement et au maintien de la grossesse. Ces changements sont principalement orchestrés par la progestérone et les estrogènes, hormones sexuelles stéroïdiennes synthétisées à partir du cholestérol. Les niveaux de ces 2 hormones fluctuent tout au long de la vie de la femme avec les cycles menstruels, mais c'est avec la grossesse que s'opèrent les changements les plus drastiques. En effet, les taux sériques de progestérone et d'estrogènes augmentent progressivement tout au long de la grossesse pour culminer au troisième trimestre et revenir à des taux normaux après l'accouchement. Ces changements hormonaux qui régissent les cycles menstruels ainsi que la grossesse sont plus prononcés dans le tractus génital mais ces changements sont également visibles au niveau systémique. Les modifications hormonales ayant cours au cours de la

grossesse sont régulées par l'unité foeto-placentaire et dépendent des interactions entre la mère et le fœtus (Doria *et al.* 2006b).

**La progestérone** est l'hormone gestationnelle par excellence, elle est en effet essentielle à l'établissement et au maintien de la gestation. En deçà d'une concentration sérique 10 ng/ml de progestérone il y a avortement spontané et en dessous de 5 ng/ml aucune grossesse n'est possible (Nygren *et al.* 1973; Pepe and Albrecht 2008). Cette hormone permet la décidualisation (préparation de la paroi utérine à l'implantation) et le maintien de la grossesse en favorisant notamment la production de nombreuses autres hormones et protéines (Pepe and Albrecht 2008). La production de progestérone augmente de façon linéaire avec la progression de la grossesse, atteignant des niveaux 10 fois supérieurs à la concentration physiologique hors grossesse (figure 17). La progestérone maintient la grossesse en exerçant également des propriétés anti-abortives (Piccinni *et al.* 2000a; Piccinni *et al.* 2000b).

**Les estrogènes** ou œstrogènes produites par la femme enceinte sont au nombre de 3; on dénote l'œstrone (E1), l'œstradiol (E2) et l'œstriol (E3). L'œstradiol est la plus importante des 3, ayant le plus d'influence sur le cycle menstruel et la grossesse. Elles permettent entre autre le maintien de la production de progestérone (Pepe and Albrecht 2008). Les estrogènes sont essentielles au bon déroulement de la grossesse, mais contrairement à la progestérone, certaines études ont montré que la grossesse peut être maintenue à de faibles niveaux d'estrogènes (Pepe and Albrecht 2008; Shozu *et al.* 1991). Tout comme pour la progestérone, les niveaux d'estrogènes sont eux aussi augmentés de façon linéaire au cours de la grossesse (Figure 17).



**Figure 17. Concentrations plasmatiques moyennes de la progestérone (P) et des estrogènes [œstrone (E1), œstradiol (E2) et œstriol (E3)] au cours de la grossesse.**

Selon les données de (Johansson 1969; Levitz and Young 1977).

## 8.2. L'immunité maternelle

### 8.2.1. Effets immunomodulateurs de la progestérone et des estrogènes

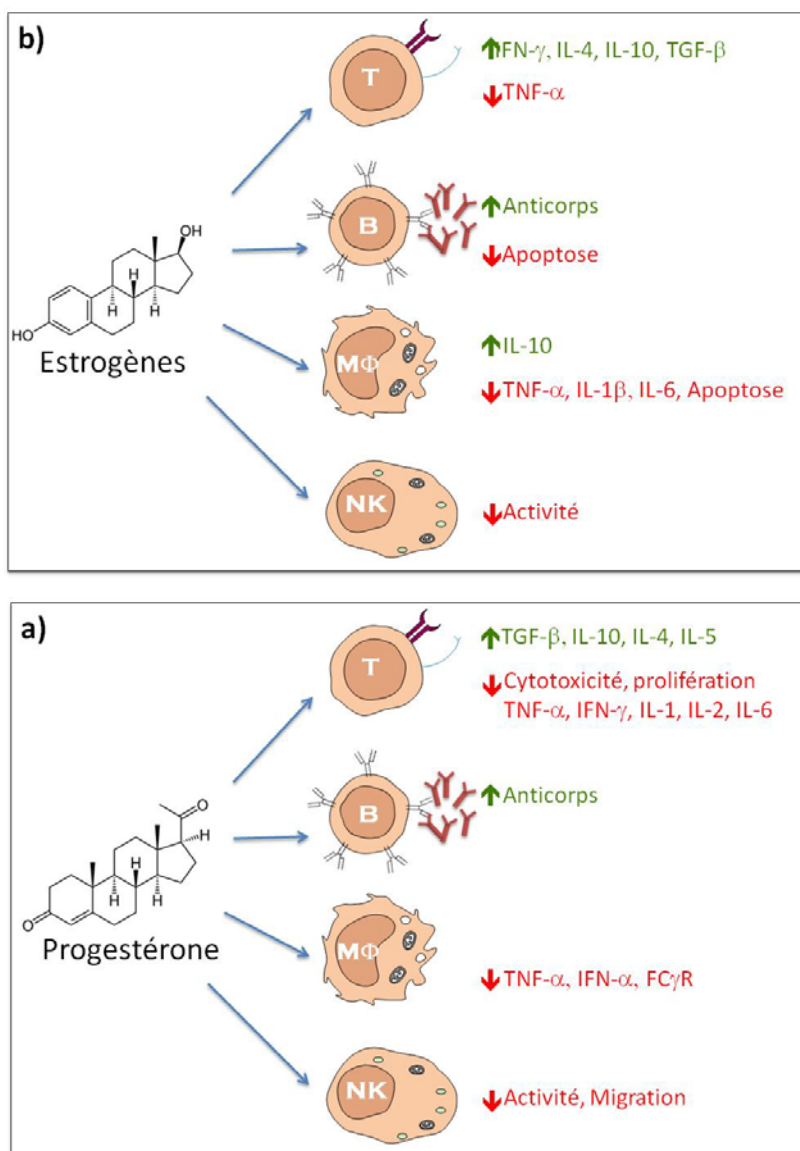
La plupart des cellules du sang périphérique, cellules immunitaires, expriment des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone et sont donc régulées par ces hormones (Dosiou *et al.* 2008; Phiel *et al.* 2005; Pierdominici *et al.* 2010). Les effets généralement observés des estrogènes et de la progestérone sont une inhibition des réponses pro-inflammatoires et une stimulation des réponses anti-inflammatoires.

**La progestérone** a des effets anti-inflammatoires; elle inhibe la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 et IFN- $\gamma$  par les lymphocytes humains. Elle inhibe également l'activité des cellules NK ainsi que la réponse T et la cytotoxicité des lymphocytes T en inhibant l'expression de la perforine.

D'un autre côté, la progestérone stimule les réponses Th2 via la stimulation de l'expression d'IL-4, IL-5 et IL-10 par les lymphocytes (Hel *et al.* 2010; Straub 2007) diminuant ainsi la réponse des lymphocytes T (Canellada *et al.* 2002) (Figure 18).

**Les estrogènes** ont un rôle très complexe qui dépend de leur concentration, du type de cellules cibles et du microenvironnement entre autres. En effets les estrogènes à des concentrations élevées (e.g grossesse) versus faibles (e.g ménopause) ont des effets opposés (Straub 2007). À des concentrations gestationnelles, les estrogènes inhibent des voies pro-inflammatoires importantes, telles que le TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, l'expression de iNOS (Nitric oxide synthase inductible), la production des MMP (metalloproteases de la matrice extracellulaire) , et l'activité des cellules NK (*Natural Killer*). D'un autre coté, à ces mêmes concentrations, les estrogènes stimulent les voies anti-inflammatoires telles que l'IL-4, IL-10, TGF $\beta$ , TIMP (inhibiteur de metalloprotéases tissulaires) entre autres. Les estrogènes stimulent également la production des anticorps. Les effets les plus importants des estrogènes à fortes concentrations telles que celles retrouvées en grossesse, sont résumés dans la figure 18.

En somme, les effets de la progestérone et des estrogènes favorisent une réponse Th2 tout en inhibant les réponses Th1 dans les cellules immunitaires (Zen *et al.* 2010). Une des modifications immunologiques les plus importantes au cours de la grossesse est l'augmentation de la réponse des lymphocytes B, due à l'augmentation progressive de la progestérone et des estrogènes au cours de la grossesse (Doria *et al.* 2006a; Straub 2007).



**Figure 18. Effet immunomodulateurs de la progestérone (a) et des estrogènes (b).**

Les effets stimulants (↑) ou inhibants (↓) des hormones sur la réponse des Lymphocytes T (T), des lymphocytes B (B), des macrophages et cellules dendritiques (M $\Phi$ ) et des cellules NK (NK) est représentée. A partir des données (Hel *et al.* 2010; Straub 2007; Zen *et al.* 2010).



### 8.2.2. Le biais Th2

Ces effets immunomodulateurs des hormones stéroïdiennes laissent présager d'une réponse immunitaire fortement biaisée vers la réponse Th2 chez la femme enceinte.

En effet, dès 1953 la grossesse fut associée à un état de relative immunosuppression nécessaire à l'établissement et la maintenance de la tolérance materno-fœtale face aux antigènes paternels présentés par les cellules fœtales (Billingham *et al.* 1953). Depuis, la grossesse a été associée à un "phénomène Th2", caractérisée par une diminution des réponses Th1 et augmentation des réponses Th2.

Le biais Th2 est observable aussi bien à l'interface materno-fœtale qu'au niveau systémique. Toutefois, ce biais est bien plus prononcé dans le milieu intra-utérin et le biais systémique reste encore l'objet de débats (Chaouat 2007; Munoz-Valle *et al.* 2003).

Les lymphocytes du sang périphérique des femmes enceintes expriment en très grande quantité de l'IL-4 et l'IL-6 et ont une expression diminuée d'IL-1 $\beta$  et IFN- $\alpha$  (Tranchot-Diallo *et al.* 1997). De plus on observe une répression de la réponse à médiation cellulaire avec notamment une diminution du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en circulation (Pazos *et al.* 2012; Watanabe *et al.* 1997). Le nombre de cellules T régulatrices, cruciales dans la maintenance de la tolérance materno-fœtale, est dramatiquement augmenté au cours de la grossesse (Somerset *et al.* 2004). On observe également une diminution de la taille du thymus au cours de la grossesse.

Les lymphocytes B jouent un rôle complexe au cours de la grossesse et toutes les études s'accordent à dire que leurs fonctions sont grandement modifiées au cours de la gestation (Medina *et al.* 1993; Muzzio *et al.* 2013; Narita *et al.* 2000). Il en résulte principalement une augmentation de la production d'immunoglobuline de classe 1, 2 et 3 au cours de la grossesse (Wilson *et al.* 2001). Cette augmentation est également observée chez les femmes prenant des contraceptifs hormonaux et même au cours du cycle menstruel durant la phase pré-ovulatoire (Franklin and Kutteh 1999; Straub 2007).

Malgré le fait que les données et observations sur la réponse immunitaire de la femme enceinte soient éparpillées et souvent contradictoires, de nombreuses évidences vont dans le sens de ce biais Th2 au cours de la grossesse.

En effet, les avortements récurrents spontanés et les fausses couches précoces ont tous été associés à un biais Th1 au cours de la grossesse (Kwak-Kim *et al.* 2005) ; caractérisé par un excès de production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF (Hill 1995; Jenkins *et al.* 2000; Raghupathy *et al.* 1999), et par une activité augmentée des cellules NK (Ntrivalas *et al.* 2001).

Aussi, beaucoup de maladies auto-immunes/inflammatoires à médiation cellulaire telles que la sclérose en plaques (Confavreux *et al.* 1998), la polyarthrite rhumatoïde (Spector and Da Silva 1992), et le psoriasis (Tauscher *et al.* 2002) voient souvent une rémission chez la femme enceinte. De plus, les maladies auto-immunes associées à la réponse humorale, telles que le lupus érythémateux (Garsenstein *et al.* 1962), semblent s'aggraver au cours de la grossesse.

### **8.2.3. Les maladies infectieuses en grossesse**

Les réponses Th1 étant diminuées au cours de la grossesse, qu'en est-il des maladies infectieuses chez les femmes enceintes ?

Les femmes enceintes ont tendance à être plus susceptibles à certaines maladies infectieuses. En effet, les femmes enceintes montrent plus de susceptibilité à la listériose (Gellin *et al.* 1991; Schuchat *et al.* 1992), à la toxoplasmose aiguë (Avelino *et al.* 2003), et également plus enclines à développer la lèpre, phase systémique de l'infection à *mycobacterium leprae* (Lyde 1997). Enfin, la malaria entraîne la complication bien connue de la grossesse qu'est le paludisme placentaire (Rogerson *et al.* 2007).

Les infections virales ne sont pas en reste, en effet, les infections par Influenza (Freeman and Barno 1959), les virus de la rougeole (Atmar *et al.* 1992), du SRAS (Wong *et al.* 2003), et de la varicelle (Daley *et al.* 2008; Harris and Rhoades 1965) sont plus sévères chez la femme enceinte. L'hépatite E est particulièrement sévère chez ces dernières, conduisant à la mort

dans 15-20% des cas (Navaneethan *et al.* 2008). Durant l'infection par le virus de l'hépatite C, les femmes enceintes voient leur charge virale plasmatique augmenter au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse (Gervais *et al.* 2000).

#### **8.2.4. Une réponse immunitaire robuste**

Étant donné toutes ces évidences, il est facile d'associer la grossesse à un état de prédominance Th2 de réponse Th1 inhibée.

Néanmoins, les changements immunitaires durant la grossesse sont plus complexes que le simple paradigme Th1/Th2, et sont encore mal compris. En fait, les réponses Th1 et Th2 sont toutes les 2 importantes et nécessaires et coopèrent à différents stades de la gestation (Wilczynski 2005).

Les cytokines Th1 sont essentielles à la période de péri-implantation favorisant l'angiogenèse (via les cellules NK utérines), promouvant l'établissement des réponses Th2 et régulant le processus de placentation (remodelage endothélial). De plus, la réponse pro-inflammatoire est essentielle à l'initiation de l'accouchement (Romero *et al.* 2006) et aux défenses contre les infections tout au long de la grossesse (Mor and Cardenas 2010).

L'immunité maternelle n'est pas incapacité et ne laisse pas la mère sans défenses face aux pathogènes. En fait, la réponse à médiation cellulaire maternelle est efficace contre de nombreuses maladies infectieuses telles que l'infection au VIH, et la tolérance immunitaire n'est pas due à une perte des fonctions (Constantin *et al.* 2007) et du nombre (Tallon *et al.* 1984) des cellules T CD8<sup>+</sup>. Les femmes enceintes sont également capables de monter une réponse robuste à la humorale et cellulaire contre HCV (Troesch *et al.* 2005) ainsi qu'une réponse cellulaire robuste contre le VIH-1 (Jolette *et al.* 2015).

Il est supposé que des augmentations du nombre des monocytes, cellules dendritiques, les neutrophiles et les défensines sériques pourraient compenser des diminutions de cellules T, NK et B (Pazos *et al.* 2012).

## 9 Le VIH-1 en grossesse

### 9.1. Effet des hormones sexuelles sur le VIH-1

#### 9.1.1. Différences sexuelles

Le rôle des hormones sexuelles dans l'infection à VIH-1 est encore mal compris. Toutefois, les différences observées entre hommes et femme quant à la progression de la maladie laissent penser que les hormones sexuelles influenceraient la pathogenèse du virus.

En effet, tandis que les femmes infectées présentent de plus faibles charges virales et de plus forts taux de LT CD4<sup>+</sup> en début d'infection, à des charges virales et taux de CD4 similaires à ceux des hommes, les femmes montrent un risque accru de développer un SIDA (Evans *et al.* 1997; Farzadegan *et al.* 1998; Gandhi *et al.* 2002; Katzenstein *et al.* 1996; Lyles *et al.* 1999; Sterling *et al.* 1999). Selon Meier *et al.*, cette différence est attribuable à une plus grande production d'IFN- $\alpha$  en réponse à une stimulation par le VIH-1 via le TLR7 par les cellules dendritiques plasmacitoïdes des femmes par rapport à celles des hommes. Ceci résultant en une plus grande activation immunitaire via les LTCD8<sup>+</sup>. Cette production d'IFN- $\alpha$  est fonction des concentrations en progestérone (Meier *et al.* 2009).

D'autre part, au cours du cycle menstruel, les femmes montrent une diminution de la charge virale dans le tractus génital en phase préovulatoire, moment où les niveaux d'estrogènes atteignent leur pic (Money *et al.* 2003).

#### 9.1.2. Contraceptifs hormonaux

Les changements induits par les hormones sexuelles féminines pourraient altérer l'infectiosité du virus et/ou la susceptibilité de l'hôte à l'infection (Baeten and Overbaugh 2003; Lavreys *et al.* 2004; Martin *et al.* 1998). En accord avec cette notion, l'utilisation de contraceptifs hormonaux est fortement associée au relargage du VIH-1 dans les sécrétions cervico-vaginales (Mostad *et al.* 1997) et une tendance à l'association entre de fortes doses de contraceptifs et

l'acquisition du VIH-1 ont été rapportées (Lavreys *et al.* 2004). Ce qui est probablement dû à l'augmentation de l'expression de CCR5 sur les cellules T CD4<sup>+</sup> cervicales (Prakash *et al.* 2002; Sheffield *et al.* 2009).

Concernant les effets de ces contraceptifs sur l'évolution de la maladie, les études sont fortement contradictoires entre elles et les résultats non-concluants. Alors que certaines études montrent une accélération de la maladie chez les femmes sous contraceptifs, d'autres ne voient aucun effet (Hel *et al.* 2010).

### **9.1.3. Études *in vitro* et chez le singe**

Quoi qu'il en soit, des évidences *in vitro* et chez le singe montrent que les hormones sexuelles influencent la réplication du VIH. Certains ont montré que la progestérone et les estrogènes inhibent la réplication du VIH-1 dans les PBMC (Asin *et al.* 2008) et les cellules placentaires (Munoz *et al.* 2007) notamment en inhibant l'activation de la transcription des gènes viraux (Asin *et al.* 2008; Lee *et al.* 1997).

De plus, le traitement des singes avec du Depo-Provera (contraceptif hormonal dérivé de la progestérone) entraîne une augmentation de la charge virale et de la diversité du virus, probablement la conséquence des effets immunosuppresseurs de la progestérone (Trunova *et al.* 2006).

En conclusion, il se pourrait que les effets des hormones sexuelles sur la réplication du VIH-1 soient le résultat d'un équilibre entre l'activation/inhibition de la transcription du VIH-1 et la régulation des cytokines pro-inflammatoires.

## **9.2. Évolution de la maladie chez la femme enceinte**

Qu'en est-il concrètement de la réponse immunitaire anti-VIH-1 et de la progression de la maladie au cours de la grossesse?

Alors qu'il est admis que les femmes enceintes sont plus susceptibles à l'acquisition de l'infection à VIH-1 (Gray *et al.* 2005), l'influence potentielle de la grossesse sur la réponse immunitaire anti-VIH-1 et la progression de la maladie reste encore mal comprise et l'objet de débats.

Les études avant l'introduction de la HAART ont montré que la grossesse accélérât la progression de la maladie définie comme des événements reliés au SIDA ou la mort, ou n'avaient pas d'effets (French and Brocklehurst 1998; Hocke *et al.* 1995). Les études réalisées après l'introduction de la HAART ont démontré au contraire des effets protecteurs de la grossesse sur la progression de la maladie (Le Moing *et al.* 2008; Minkoff *et al.* 2003; Tai *et al.* 2007). De plus, il semblait y avoir un avantage de survie chez les femmes ayant 2 grossesses comparé à une grossesse (Tai *et al.* 2007). Ce qui pourrait très bien être expliqué par le fait que les femmes ayant une meilleure santé sont plus à même de tomber enceintes, ou cela peut être un effet plus bénéfique de la HAART. Il en va de même pour les décomptes CD4 et la charge virale qui n'ont pas l'air d'être affectés par la grossesse pas d'effet notable de la grossesse à l'ère de la HAART (Le Moing *et al.* 2008; Minkoff *et al.* 2003).

Toutefois en ce qui concerne l'immunité anti-VIH-1, même à l'ère de la HAART les données sont toujours controversées. Alors que certaines études stipulent que les facteurs immunologique anti-VIH-1 ne sont en aucun cas différents entre les femmes enceintes et les femmes non-enceintes (Kolte *et al.* 2011; Rich *et al.* 1999); d'autres montrent des modulations de l'immunité anti-VIH-1 associés à la grossesse (Hygino *et al.* 2012; Mikyas *et al.* 1997). De plus, des travaux réalisés dans notre laboratoire montrent que la réponse CTL anti-VIH-1 n'est pas modifiée par l'initiation de la grossesse (Jolette *et al.* en préparation).

Néanmoins, dans ces études sur la grossesse, il est important de prendre en considération le stade de la gestation ainsi que la présence ou l'absence de traitement qui peuvent grandement influencer les résultats. En effet, les changements dans la réponse anti-VIH-1 sont préférentiellement cantonnés au 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse (Mikyas *et al.* 1997; Richardson and Weinberg 2011). L'activation immunitaire vue en fin de grossesse, proche de l'accouchement pourrait potentialiser la réplication du virus et serait à l'origine de

l'augmentation de la charge virale observée chez les femmes enceinte à ce stade de la gestation (Dickover *et al.* 1996).

### **9.3. Le tropisme en grossesse**

On sait que les virus X4 et R5X4 peuvent être transmis de la mère à l'enfant, faisant de la TME la principale source de virus X4 chez l'enfant infecté (Duri *et al.* 2011; Huang *et al.* 2009).

Le seul cas d'évolution du tropisme en grossesse a été rapporté par Tscherning-Casper *et al.* en 2000. Ils montraient un élargissement du spectre d'utilisation des corécepteurs au cours de la grossesse d'un tropisme CCR5 simple à un bi-tropisme CCR5/CXCR6 (Tscherning-Casper *et al.* 2000). Depuis, aucune autre étude n'a analysé l'évolution de l'utilisation des corécepteurs en grossesse.

#### **9.3.1. Rational du switch en grossesse**

Une hypothèse du switch suggère que les cytokines produites durant la réponse immunitaire peuvent contribuer à la pression sélective nécessaire à un changement de l'utilisation des corécepteurs. En effet, dérivée de l'hypothèse de la disponibilité cellulaire, l'expression différentielle des corécepteurs du VIH-1 en fonction de la polarisation de la réponse immunitaire (Th1 ou Th2) favoriserait le développement des virus R5 ou X4.

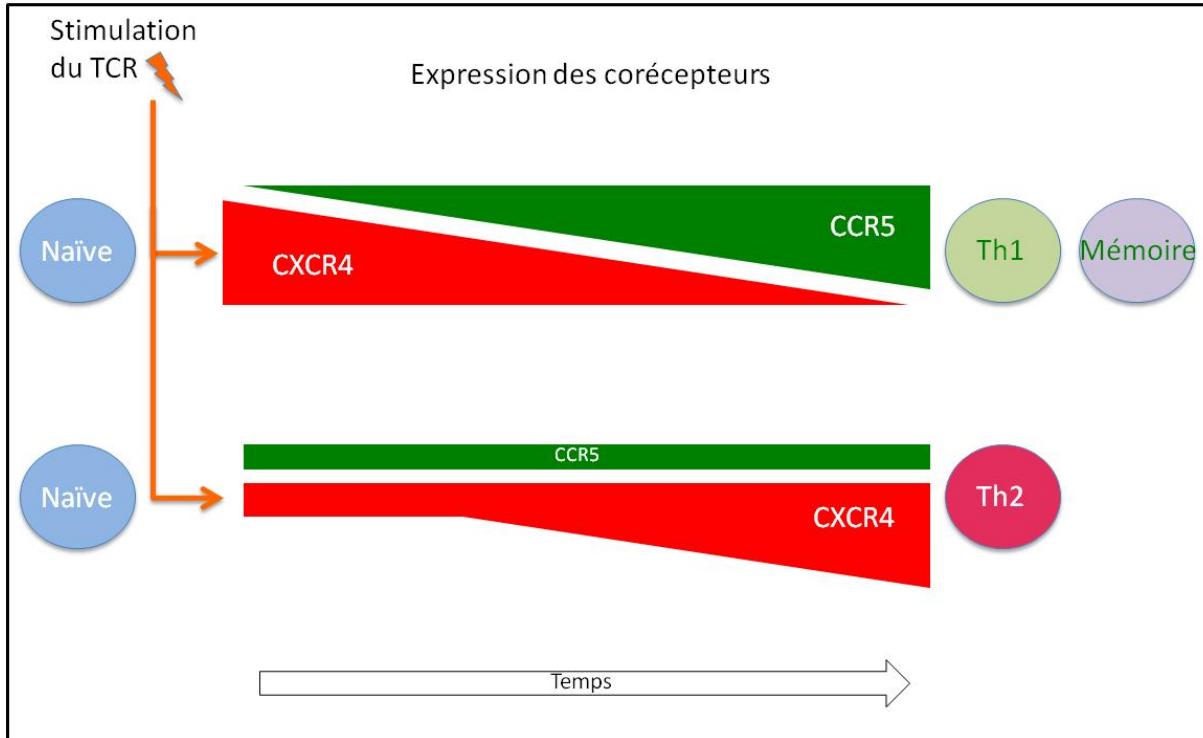
Dès la fin des années 90, une polarisation Th1 a été associée à l'expression de CCR5 tandis que la polarisation Th2 était associée à une expression de CXCR4 (Sallusto *et al.* 1998a) (Figure 19).

Ainsi, l'expression de CCR5 est augmentée à la surface des cellules Th1 par les cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IFN- $\gamma$  (Loetscher *et al.* 1998; Sallusto *et al.* 1998b), tandis que l'IL-4, cytokine associée à la réponse Th2, réprime l'expression de CCR5 tout en favorisant l'expression de CXCR4 (Galli *et al.* 1998; Jourdan *et al.* 1998).

De même, la réplication du virus dans les 2 types de cellules reflète l'expression différentielle des corécepteurs. En effet, des études *in vitro* ont montré que les virus X4 se répliquaient plus efficacement dans les cellules polarisées Th2 et inversement, les virus R5 dans les cellules Th1 (Annunziato *et al.* 2000; Maggi *et al.* 1994; Tanaka *et al.* 1997).

De façon intéressante, certaines études suggèrent l'association d'un biais Th2 avec le switch de tropisme du VIH-1 de NSI à SI (Tanaka *et al.* 1997; Torres *et al.* 1998; Valentin *et al.* 1998). De même le polymorphisme du promoteur de l'IL-4 (IL4 -589T) induisant une surexpression de la cytokine a été associée à une accélération du switch de tropisme et de la progression de la maladie chez les individus infectés (Nakayama *et al.* 2000) tandis que d'autres études ont observé un effet protecteur ou pas d'effet (Kwa *et al.* 2003; Wichukchinda *et al.* 2006).





**Figure 19. Profil d'expression des corécepteurs du VIH-1 en fonction de la polarisation des lymphocytes TCD4+.**

Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves et Th2 expriment CXCR4 à de forts niveaux. Les cellules mémoires et les cellules Th1 montrent par contre une forte expression de CCR5. Adapté de (Mariani *et al.* 2011).

Finalement, le groupe de Cheng-Mayer a montré en 2006 que le traitement de macaques au Depo-provera (contraceptif hormonal) favorisait la réplication des virus X4 par rapport aux virus R5 chez des singes infectés avec des virus R5 et X4 (Trunova *et al.* 2006). Ce résultat reflétant les effets de la progestérone (biais Th2), pourrait bien être la conséquence d'une plus grande disponibilité de cellules exprimant CXCR4, mais pourrait être aussi la conséquence de la répression des réponses CTL. Ceci est en accord avec leur première étude dans le même système démontrant le contrôle immunitaire des virus X4 par les LTCD8<sup>+</sup> (Harouse *et al.* 2003).

## **10 Problématiques, hypothèses et objectifs**

### **10.1. Le gène de l'enveloppe en grossesse**

Tel que présenté ci-haut, la grossesse s'accompagne de nombreux changements hormonaux pouvant grandement affecter la réponse immunitaire et la disponibilité de cellules cibles en terme d'expression de corécepteurs. L'évolution du VIH-1, du gène de l'enveloppe et du tropisme sont intimement liés au terrain immunitaire sur lequel le virus se développe. Cependant le moment et la manière dont le gène *env* et le tropisme du virus évoluent durant la grossesse restent très mal connus, malgré le fait que le phénomène soit particulièrement pertinent en ce qui concerne la progression de la maladie et/ou la transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant. En l'état actuel des connaissances, nous ne savons pas comment se comportent les gènes du virus en grossesse et le switch n'a été décrit qu'une fois mais montrant une évolution de R5 vers R5X6 au cours de la grossesse.

Nous émettons alors les hypothèses que le switch de tropisme de R5 vers X4 est possible et observable en grossesse et que la pression sélective exercée sur l'enveloppe virale diffère entre les femmes enceintes et non-enceintes.

Nos objectifs pour cette partie qui sera présentée dans les 2 premiers chapîtres sont :

- Analyser l'évolution des déterminants du tropisme ainsi que le génotype et le phénotype des virus chez les femmes au cours de la grossesse.
- Décrire et comparer la pression sélective exercée sur le gène de l'enveloppe du VIH-1 chez des femmes enceintes et non enceintes.

### **10.2. Le gène de l'enveloppe à l'échelle de la population**

Le VIH-1 évolue à l'échelle de la population, cette évolution est à l'origine de la diversité du virus. L'évolution du VIH-1 chez un individu est ce qui entraîne l'évolution du virus à l'échelle d'un groupe d'individus faisant partie du même réseau de transmission, et au final

cette évolution se traduit à l'échelle de l'épidémie, à l'échelle de la population. Il convient de se poser la question de l'évolution du tropisme à l'échelle de la population.

Nous émettons l'hypothèse que le tropisme du VIH-1 évolue à l'échelle de la population amenant à un switch progressif du tropisme à l'échelle d'un sous-type entier.

Notre objectif pour cette partie de l'étude sera d'analyser l'évolution des déterminants du tropisme dans les séquences d'enveloppe VIH-1 au cours de l'épidémie.

**CHAPITRE I : EVOLUTION DE L'UTILISATION DES  
CORECEPTEURS DU VIH-1 ET SWITCH DU  
TROPISME AU COURS DE LA GROSSESSE**

## Résumé

Le switch de l'utilisation des corécepteurs de CCR5 vers CXCR4 par le VIH-1 est associé à la progression de la maladie. Afin de documenter l'évolution du tropisme du virus au cours de la grossesse, nous avons entrepris une étude longitudinale du gène de enveloppe chez un groupe de femmes enceintes infectées avec le VIH-1 de clade B (n=10) ou non-B (n=9).

Pour ce faire, des amplifications par PCR des régions V1 à V3 ont été réalisées sur l'ARN viral plasmatique, suivies de clonage puis séquençage du gène.

La présence de variants X4 a été prédite par les algorithmes de prédiction du tropisme Geno2pheno et PSSM<sub>X4R5</sub> chez 9 sur 19 sujets (appelées sujets X4) de façon indépendante du clade du virus. 6 des 9 sujets X4 montraient des décomptes de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> < 200 cellules/mm<sup>3</sup>. La présence de séquences X4 a été confirmée chez 5 sujets X4 par le test phénotypique de Trofile. Chez 5 des 9 sujets X4, un déclin significatif du taux de fausse positivité de Geno2pheno au cours de la grossesse était invariablement accompagné d'une augmentation significative du score PSSM<sub>X4R5</sub>, de la charge nette de V3 et de la relative représentation des séquences X4. De plus, l'évolution du tropisme vers l'utilisation de CXCR4 était également observable dans la structure primaire de V2 des sujets X4, où une accumulation de substitutions associées au tropisme X4 s'opérait avec la progression de la grossesse.

Les résultats de ces expériences clairement une évolution de l'utilisation de CCR5 vers CXCR4 au cours de la grossesse chez une fraction significative de femmes infectées par le VIH-1. Ces résultats nous informent sur les changements dans les interactions hôte-pathogène menant au modelage de la population virale et du tropisme du virus au cours de la grossesse. De même, ces résultats apportent des éléments supplémentaires vers la compréhension de la biologie de la TME du VIH-1.

## **EVOLUTION OF HIV-1 CORECEPTOR USAGE AND CORECEPTOR SWITCHING DURING PREGNANCY.**

Doris G. Ransy,<sup>1,2</sup> Alena Motorina,<sup>1,2</sup> Natacha Merindol,<sup>1,2</sup> Bertine S. Akouamba,<sup>1,2</sup> Johanne Samson,<sup>3</sup> Yolanda Lie,<sup>4</sup> Laura A. Napolitano,<sup>4</sup> Normand Lapointe,<sup>3,5</sup> Marc Boucher,<sup>3,6</sup> Hugo Soudeyns,<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada. <sup>2</sup>Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. <sup>3</sup>Centre maternel et infantile sur le SIDA, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada. <sup>4</sup>Monogram Biosciences Inc., South San Francisco, California, USA. <sup>5</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. <sup>6</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

**Running title:** HIV-1 tropism evolution during pregnancy.

### **ABSTRACT**

Coreceptor switch from CCR5 to CXCR4 is associated with HIV disease progression. To document the evolution of coreceptor tropism during pregnancy, a longitudinal study of envelope gene sequences was performed in a group of pregnant women infected with HIV-1 of clade B (n=10) or non-B (n=9). PCR amplification of the V1-V3 region was performed on plasma viral RNA, followed by cloning and sequencing. Using Geno2pheno and PSSM<sub>X4R5</sub>, the presence of X4 variants was predicted in 9 of 19 subjects (X4 subjects) independent of HIV-1 clade. Six of 9 X4 subjects exhibited CD4<sup>+</sup> T cell counts < 200 cells/mm<sup>3</sup>, and presence of X4-capable virus was confirmed using recombinant phenotypic assay in 4 of 7 cases where testing was successful. In 5 of 9 X4 subjects, a statistically significant decline in the Geno2pheno false positive rate was observed during the course of pregnancy, invariably accompanied by progressive increases in the PSSM<sub>X4R5</sub> score, the net charge of V3, and the

relative representation of X4 sequences. Evolution toward X4 tropism was also echoed in the primary structure of V2, as accumulation of substitutions associated with CXCR4 tropism was seen in X4 subjects. Results from these experiments provide first evidence of ongoing evolution of coreceptor utilization from CCR5 to CXCR4 during pregnancy in a significant fraction of HIV-infected women. These results inform changes in host-pathogen interactions that lead to a directional shaping of viral populations and viral tropism during pregnancy, and provide insights into the biology of HIV transmission from mother to child.

## INTRODUCTION

HIV-1 enters target cells *via* interactions of its envelope glycoprotein with CD4 and a coreceptor, usually either CCR5 or CXCR4. The main genetic determinants of coreceptor tropism lie within the V3 loop of gp120, and include the sequence of the crown of V3, amino acid identity at positions 11 and 25, net charge of V3, and N-linked glycosylation. This central role of the V3 loop is a universal feature of every HIV-1 clade.<sup>1,2</sup> In combination with changes in V3, changes in other regions of the envelope protein, including V1,<sup>3</sup> V2,<sup>4-6</sup> V4,<sup>7</sup> and C4,<sup>8</sup> can influence coreceptor requirement. The majority of newly acquired HIV infections are thought to originate from viruses that use CCR5 (R5 viruses), presumably because their tropism allows these variants to infect cellular types that reside within or beneath mucosal surfaces.<sup>9</sup> However, recent reports suggest that viruses using CXCR4 (X4 viruses) are also present in recently-infected subjects and are in fact more commonly transmitted than previously thought.<sup>10,11</sup> This is also true for mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1, where infection of the infant by R5 variants was generally thought to be the rule, even when the mother carried mostly X4 viruses.<sup>12,13</sup> However, recent studies have shown that X4 and R5X4 HIV-1 variants can be transmitted to the infant before and during delivery, establishing MTCT as an important source of X4 viruses in children.<sup>14-16</sup> Long term HIV-1 infection and accelerated clinical progression towards AIDS are associated with a shift in coreceptor usage from mainly R5 to R5X4 and X4 viruses.<sup>17,18</sup> Approximately 50% of subjects infected with HIV-1 subtype B show evidence of coreceptor switching, a varying incidence of which was observed in infections involving other HIV-1 clades.<sup>1,19,20</sup> Studies in SHIV-infected rhesus macaques have shown that host HIV-specific immune responses exert an important influence on viral tropism and coreceptor usage, and that the loss of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to

the emergence of X4 viral variants.<sup>21</sup> During pregnancy, the establishment and maintenance of foetomaternal tolerance is associated with significant modulations of maternal immunity, including increased synthesis of immunoglobulins and inhibition of cell-mediated immune responses.<sup>22-24</sup> Tscherning-Casper *et al.* reported broadening of coreceptor usage during pregnancy from CCR5 to dual CCR5 and CXCR6, an alternate coreceptor that can mediate HIV-1 entry into target cells, at least *in vitro*.<sup>25</sup> Yet the timing and manner in which the *env* gene and CXCR4 coreceptor tropism evolve during pregnancy remain poorly understood, in spite of the fact that these phenomena might be particularly relevant with regards to HIV disease progression and/or transmission of HIV-1 from mother to child.<sup>26,27</sup> In the present study, we examined evolution of the sequence of the HIV-1 *env* gene and of determinants associated with coreceptor tropism in a group of pregnant women infected with clade B or non-B HIV-1, and provide first evidence of coreceptor switching from CCR5 to CXCR4 during pregnancy. These results inform the interplay between evolution of *env* sequences and coreceptor tropism in the context of pregnancy.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study subjects.**

Study subjects were participants to the Centre maternel et infantile sur le SIDA mother-child cohort (CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada). Nineteen pregnant HIV-infected women were enrolled in the study, of whom 5 were followed during 2 consecutive pregnancies (24 pregnancies total). Inclusion criteria were based on (i) availability of at least 1 serum sample per trimester of pregnancy; and (ii) HIV-1 viral load above the lower limit of detection. First, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy were defined as 1-13, 14-28, and 29-41 weeks of gestation, respectively. Gestational age and estimated date of fertilization were estimated based on the first day of the last menstrual period (LMP) or from fetal biometry. HIV-1 viral load was measured using the Versant HIV-1 RNA 3.0 assay (Bayer, Pittsburgh, PA, USA), with a lower limit of detection of 1.70 log<sub>10</sub> HIV-1 RNA copies/ml plasma. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts were measured by flow cytometry. HIV genotyping was based on sequencing of the HIV-1 *pol* and *env* genes.<sup>28</sup> Informed consent was obtained from all study participants. This research protocol was conducted according to the guidelines of the Ethics Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada.



### **Amplification and sequencing of the *env* gene.**

HIV-1 viral RNA was extracted from frozen plasma samples using the QIAamp viral extraction mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and a 945 nucleotides DNA fragment spanning the Env V1-V3 region (positions 6430-7374) was amplified as previously described.<sup>29</sup> Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was performed using primers E00 and ES8B, followed by nested PCR with primers E20 and E115.<sup>29</sup> PCR products were cloned into TOPO TA (Invitrogen, Mississauga, Ontario, Canada). A mean of 18 plasmid clones per time point were randomly selected for unidirectional DNA sequencing (ABI 3730xl, Applied Biosystems, Concord, Ontario, Canada).

### **Sequence analysis.**

Sequence alignment was carried out using the ClustalW tool embedded in MEGA version 4.<sup>30</sup> Sequences were manually edited and codon-aligned with HMMER v2.32.<sup>31</sup> Viral tropism was predicted for each individual clone based on the amino acid sequence of the V3 loop using a) the Geno2pheno algorithm with a false positive rate (FPR) of 5.75% (G2P<sub>5.75</sub>);<sup>32</sup> and b) PSSM<sub>X4R5</sub> where sequences with scores  $\leq -6.96$  were considered R5, sequences with scores  $\geq -2.88$  were considered X4, and the tropism of sequences with scores in between these values was assigned based on whether they possessed basic amino acid residues at either position 11 or position 25.<sup>33</sup> Numbers of potential N-linked glycosylation sites (PNGS) were calculated using N-GlycoSite<sup>34</sup> and corrected manually. Subjects in whom X4 sequences were detected using either G2P<sub>5.75</sub> or PSSM<sub>X4R5</sub> were termed « X4 subjects », and subjects in whom only R5 sequences were detected were termed « R5 subjects ». The net charges of V2 and V3 were calculated as the number of positively charged amino acid residues (R, K, H) minus the number of negatively charged (D, E) amino acid residues. In order to provide an indicator of the proportion of X4 related mutations in a V2 sequence, a position-specific scoring matrix was assembled based on data published by Hoffman *et al.*<sup>4</sup> and Thielen *et al.*<sup>6</sup> These 2 studies have identified substitutions in V2 that occurred at different frequencies in X4 and R5 sequences. Based on these frequencies, a likelihood index for V2 was computed which is an indicator of the relative abundance of X4-associated substitutions within a given V2 sequence. Briefly, log likelihood ratios ( $\ln [f_{X4}/f_{R5}]$ ) were calculated for each of the 13 most relevant

amino acid positions in V2 (*i.e.* 161, 164-166, 169, 173, 177, 182, 184, 190-192, and 195). Substitution frequencies are listed in Supplemental Table 1. The likelihood index of a given V2 sequence was defined as the sum of log likelihood ratios derived from this sequence. The higher the index, the closer the V2 sequence was to an actual X4 sequence.

### **Recombinant phenotypic assay.**

When HIV-1 viral load was > 1000 RNA copies per ml plasma, the tropism of HIV-1 isolates was determined using an enhanced version of the Trofile<sup>®</sup> co-receptor tropism assay (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA).<sup>35,36</sup> The enhanced Trofile<sup>®</sup> assay, which is now used exclusively for patient tropism testing, has 100% sensitivity to detect X4 variants constituting as little as 0.3% of the total population. The Trofile<sup>®</sup> DNA co-receptor tropism assay (Monogram) was used when HIV-1 viral load was < 1000 RNA copies per ml plasma.<sup>37</sup> Recombinant phenotypic assay was only performed when X4-capable sequences were initially predicted using G2P<sub>5.75</sub> or PSSM<sub>X4R5</sub>.

### **Statistical analysis.**

Data were expressed as median and interquartile range (IQR). Normality of data distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Where data was normally distributed, Student's *t* test and one-way ANOVA with post test for linear trend were used to test the significance of between-groups comparisons. Where data distribution deviated from normal, the Mann-Whitney *U* test and the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test were used. Relationships between variables were tested using Spearman's rank correlation test. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## **RESULTS**

### **Clinical characteristics of study subjects.**

One plasma sample per trimester was analyzed except in the case of subjects TV1021a and TV1263, where only sequences from the 1<sup>st</sup> trimester could be amplified, and subjects TV479b and TV481a, where the first sample was taken before pregnancy (not included in the longitudinal analyses of sequence evolution). Median age at initiation of pregnancy was 27

years (IQR = 25-32). Ten of 19 subjects (52.6%) were infected with HIV-1 of clade B, 6 (31.6%) with clade C, 1 (5.26%) with clade D, 1 with clade A1 and 1 with CRF13\_cpx (Table 1 and Table 2). Median CD4 and CD8 counts at the time point closest to initiation of pregnancy were 260 (IQR = 120-360) and 730 (IQR = 480-855) cells/mm<sup>3</sup>, respectively. Median viral load at the time point closest to initiation of pregnancy was 4.27 log<sub>10</sub> RNA copies/ml (IQR = 3.81-4.58). Five subjects were followed during 2 consecutive pregnancies, for a total of 24 pregnancies examined. In the case of consecutive pregnancies, median interpregnancy interval was 1.5 years (IQR = 0.88-4.21). In 7 of 24 pregnancies, antiretroviral (ARV) treatment was introduced at a mean of 6.1 years before initiation of pregnancy (range = 1.1-13.0 years). In 15 of 24 pregnancies (62.5%), ARV treatment was initiated between week 8 and week 20. Women were treated with protease inhibitor-based therapy in 16 of 24 (66.6%) pregnancies. None of the subjects were treated with HIV-1 entry inhibitors and subject TV1267 refused treatment. HIV-1 viral load values were normally distributed ( $p > 0.0706$ ; Kolmogorov-Smirnov test) and decreased significantly during the course of pregnancy ( $p < 0.0001$ ; one-way ANOVA with post test for linear trend), consistent with introduction or intensification of ARV treatment. CD4 and CD8 counts were also normally distributed ( $p > 0.0915$ ; Kolmogorov-Smirnov test), but no significant changes were observed over the course of pregnancy ( $p = 0.3851$  and  $p = 0.7839$ , respectively; one-way ANOVA with post test for linear trend) (data not shown). No cases of MTCT were reported in any of the study participants.

### **Determination of coreceptor tropism.**

A total of 1240 *env* gene sequences were obtained and were subjected to the G2P<sub>5.75</sub> and PSSM<sub>X4R5</sub>. Variable proportions of X4 sequences, defined as sequences with a G2P FPR ≤ 5.75%, were observed in samples obtained from 9 of 19 study subjects (47.4%), for a total of 11 pregnancies independent of HIV-1 clade (Table 1). These 9 women were termed « X4 subjects », whereas the 10 others were termed « R5 subjects » (Table 2). The presence of X4 sequences was supported by PSSM<sub>X4R5</sub> in 6 of these 9 X4 subjects, though this algorithm did not predict X4 sequences in 3 others (*i.e.* TV669, TV1217, and TV479). All 3 discordant subjects were infected with HIV-1 of clade B. In the case of patient TV669, V3 sequences that were obtained were 34 amino-acid residues in length instead of 35, which is known to be

associated with a higher likelihood of discordant tropism prediction as a result of incorrect alignment.<sup>38</sup> X4 sequences in subject TV1217 had a PSSM<sub>X4R5</sub> score of -7.97 (lower than the PSSM<sub>X4R5</sub> cut-off)<sup>33</sup>, but exhibited G/R amino acid residues at positions 11/25 (data not shown), strongly suggestive that they were in fact X4 sequences. In contrast, PSSM<sub>X4R5</sub> scores of X4 sequences from TV479 were lower than the cut-off and exhibited S/E or G/E residues at positions 11/25. Finally, the presence of X4-capable virus was confirmed using recombinant phenotypic assay in 4 of 9 X4 subjects (4 of 7 subjects for whom recombinant phenotypic assay was successfully performed) (TV643, TV995, TV1151, and TV1217) (Table 1).

In the case of subject TV1261, no particular feature of V3 would seem to explain the discordant results between G2P5.75, PSSM<sub>X4R5</sub> and the Trofile<sup>®</sup> assay. Such discordant instances were previously reported in the literature,<sup>39,40</sup> though no clear-cut explanation was provided for these observations. In the present study, at least three separate amplification reactions were performed for each serum sample/time point. Such replicate amplification and population sequencing were shown in previous reports to enhance the sensitivity of the genotyping tropism tests,<sup>40,41</sup> thus providing a possible reason for the discordant results obtained for TV1261 when using algorithms versus Trofile<sup>®</sup>.

Overall, X4 subjects exhibited significantly lower median CD4<sup>+</sup> T cell counts than R5 subjects during the course of pregnancy ( $p = 0.0243$ ; Student's  $t$  test) (Figure 1A), with 6 of 9 X4 subjects exhibiting median CD4 counts  $\leq 200$  cells/mm<sup>3</sup> (Table 1), consistent with functional immunodeficiency. In addition, R5 subjects showed significantly greater CD4<sup>+</sup> T cell recovery following initiation of therapy than X4 subjects ( $p = 0.05$ ; Student's  $t$  test) (Figure 1B). Furthermore, higher median HIV-1 viral load was seen in X4 subjects as compared to R5 subjects ( $p = 0.0185$ ; Mann-Whitney  $U$  test) (Figure 1C). Both groups responded equally well to ARV therapy, as the decrease in HIV-1 viral load was not significantly different between the 2 groups ( $p = 0.2817$ ; Student's  $t$  test) (data not shown). CD8 counts, maternal age, and the composition of ARV regimens were not significantly associated with the presence of X4 sequences (data not shown). Finally, no statistically significant difference was found in the time from diagnosis between the 2 groups ( $p = 0.396$ ; Mann-Whitney  $U$  test) (data not shown).

### **Evolution of V3 sequences during pregnancy.**

To examine the evolution of V3 sequences during pregnancy, the longitudinal changes in terms of G2P FPR, PSSM<sub>X4R5</sub> scores, the net charge of V3, and the relative proportion of predicted X4-capable sequences were analyzed based on sets of viral sequences obtained using PCR, cloning and sequencing at different time points during the course of pregnancy. In this analysis, statistically significant decreases in G2P FPR, statistically significant increases in PSSM<sub>X4R5</sub> scores, and statistically significant increases in the net charge of V3 between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters were considered as evidence of evolution towards CXCR4 tropism. Progressive evolution of these three parameters was readily observed in X4 subjects, but not in R5 subjects (Figure 2). Of 11 pregnancies analyzed among the 9 X4 subjects, statistically significant decreases in G2P FPR were observed in 5 cases over the course of pregnancy (Figure 2A), along with statistically significant increases in PSSM<sub>X4R5</sub> scores (4 of 5 cases) (Figure 2B) and statistically significant increases in the net charge of V3 (5 of 5 cases) ( $p \leq 0.05$ ; Mann-Whitney  $U$  test) (Figure 2C). Of these 5 subjects, 4 also showed progressive increase in the relative proportion of predicted X4-capable sequences through time (*i.e.* TV643, TV715, TV995, and TV1261; Table 1), In subject TV1151, the frequency of predicted X4-capable sequences remained above 90% throughout pregnancy. Subjects in whom evolution of V3 sequences was not observed showed either 100% of predicted X4-capable sequences throughout pregnancy (*i.e.* TV669 and TV715b) or very low frequencies of X4-capable sequences over time (*i.e.* TV479, TV1203 and TV1217) (Table 1). In subject TV715, the frequency of X4-capable sequences rose from 45.0% to 100% during her first pregnancy (TV715a), and then remained at 100% throughout her 2<sup>nd</sup> pregnancy (TV715b) (Table 1). The frequencies of X4-capable sequences were confirmed using PSSM<sub>X4R5</sub> and other G2P false-positive rates (2% and 10%), although slightly different frequencies were obtained (data not shown). Tropism determinations were also confirmed using recombinant phenotypic assays in 3 of 5 subjects (3 of 4 subjects for whom recombinant phenotypic assay was successfully performed). Interestingly, in the case of subject TV1217, results of the recombinant phenotypic assay indicated a shift from dual-mixed in the 1<sup>st</sup> trimester to R5 in the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters that was paralleled by a progressive decline in the frequencies of predicted X4-capable sequences (Table 1). Changes in V3 amino acid sequences that were associated with evolution of coreceptor tropism were not different from those that were reported in non-

pregnant subjects. In X4 subjects, mutations involved substitutions at positions 11 or 25 for positively charged residues and/or clade-specific evolution of the V3 crown and loss of PNGS at position 6 (data not shown). No such time-dependent evolution was seen in R5 subjects, except in subject TV823 (clade B), in whom a GPGK to (G/A)PGR change in the V3 crown was observed (data not shown).

In sharp contrast, of 11 pregnancies analyzed among 9 of the 10 R5 subjects, a statistically significant decrease in G2P FPR was only observed in 1 case (TV1005;  $p \leq 0.001$ ; Mann-Whitney  $U$  test) (Figure 2A), and it was not accompanied by statistically significant increases in either PSSM<sub>X4R5</sub> scores (Figure 2B) or the net charge of V3 (Figure 2C). Similarly, subject TV1267 manifested a statistically significant increase in PSSM<sub>X4R5</sub> scores during her second pregnancy (TV1267b;  $p \leq 0.01$ ; Mann-Whitney  $U$  test) (Figure 2B), but not in G2P FPR (Figure 2A) or in the net charge of V3 (Figure 2C). Finally, subject TV1011 exhibited a statistically significant decline in the net charge of V3 (Figure 2C), but not in G2P FPR (Figure 2A) or PSSM<sub>X4R5</sub> scores (Figure 2B). Statistically significant evolution of G2P FPR, PSSM<sub>X4R5</sub> score, or the net charge of V3 during pregnancy was not observed amongst the 10 remaining subjects.

On the whole, determinants of viral tropism defined using prediction algorithms evolved during the course of pregnancy in 5 subjects in whom X4 sequences were identified using G2P<sub>5,75</sub>, including TV643 (clade B), TV715 (clade C), TV995 (clade D), TV1151 (clade A1), and TV1261 (Clade C). Taken together, these results reflect the strong association between the presence of X4 variants and the subsequent evolution of V3 sequences in pregnant women.

### **Evolution of tropism determinants in V2.**

We sought to verify whether changes in coreceptor tropism predicted based on the amino-acid sequence of V3 were also reflected in V2. Overall, consistent with previous reports,<sup>6</sup> the net charge of V2 was higher in X4 subjects than in R5 subjects, with mean values of  $+1.72 \pm 0.34$  and  $+0.70 \pm 0.47$ , respectively. However, this difference did not attain statistical significance ( $p = 0.0524$ ; Student's  $t$  test) (data not shown). In addition, no significant evolution of the net charge of V2 was observed during the course of pregnancy. The V2 likelihood index was

computed based on differential frequencies of occurrence of certain mutations in X4-capable and R5 viruses. This index reflects the abundance of X4-related mutations relative to R5-related mutations in a given V2 sequence (*i.e.* an X4 V2 sequence is expected to have a greater V2 likelihood index than a R5 V2 sequence). V2 likelihood indexes were computed for each of the 1240 HIV-1 *env* sequences obtained from our study group, and, as a validation, for a reference dataset comprised of 52 X4 and 185 R5 V2 sequences of clade A, B, C and D retrieved from the Los Alamos National Laboratory HIV Sequence Database.<sup>42</sup> As expected, when applied to the reference dataset, the V2 likelihood index was significantly higher in X4 isolates as compared to R5 isolates, with median values of -0.3463 (IQR = [-1.040] - [+1.463]) and -1.489 (IQR = [-2.569] - [-0.6064]), respectively ( $p < 0.0001$ ; Mann-Whitney *U* test) (Figure 3A). When applied to the global dataset from our study group, significantly higher V2 likelihood indexes were observed in X4 subjects than in R5 subjects, with median values of -0.2735 (IQR = [-0.8147] - [+1.434]) and -1.6730 (IQR = [-2.8240] - [-0.9983]), respectively ( $p = 0.0028$ ; Mann-Whitney *U* test) (Figure 3B). In addition, the V2 likelihood index was inversely correlated with the G2P FPR ( $r = -0.5122$ ;  $p = 0.0053$ ; Spearman's rank correlation test) (data not shown).

To examine the evolution of V2 sequences during pregnancy, longitudinal changes in the V2 likelihood index were analyzed, and statistically significant increases in the V2 likelihood index were taken as evidence of evolution towards CXCR4 tropism. Statistically significant increases in the V2 likelihood index between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters were considered as evidence of evolution towards X4 tropism. Indeed, progressive evolution of the V2 likelihood index was readily observed in 5 of 9 X4 subjects (55.6%), with statistically significant differences noted in subjects TV479b, TV643, TV715a, TV995, and TV1151 ( $p \leq 0.01$ ; Mann-Whitney *U* test). In contrast, these variations were not seen in R5 subjects, except in the case of subject TV1021b, who exhibited a significant increase in the V2 likelihood index between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters ( $p \leq 0.001$ ; Mann-Whitney *U* test), and subject TV1267a, who exhibited a significant reduction in the V2 likelihood index ( $p \leq 0.001$ ; Mann-Whitney *U* test) (Figure 3C). On the whole, these results are concordant with those obtained upon examination of V3 sequences (see above).

### **Length of V1V2 and numbers of PNGS in subjects infected with subtype C.**

Because changes in tropism towards CXCR4 usage have been associated with genetic divergence in the V1V2 loop in HIV-1 subtype C isolates, particular attention was drawn to the 2 subtype C-infected subjects in whom X4 sequences were predicted (TV715 and TV1261). In these 2 subjects, X4 clones had significantly longer V1V2 regions ( $p < 0.0001$ ; Mann-Whitney  $U$  test) and greater numbers of PNGS ( $p < 0.0015$ ; Mann-Whitney  $U$  test) than what was observed in R5 clones, a difference that was not seen in other study subjects (data not shown). A statistically significant increase in the median length of the V1V2 loop was observed during the course of the first pregnancy in subject TV715 (TV715a) ( $p < 0.0001$ ; Kruskal-Wallis test), and this increase was mainly accounted for by differences between the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> trimester and between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters ( $p < 0.001$ ; Dunn's multiple comparison test) (Figure 4A). Similarly, a statistically significant increase in the median number of PNGS in V1V2 was observed in the course of the first pregnancy in subject TV715 (TV715a) ( $p < 0.0001$ ; Kruskal-Wallis test), this increase being again accounted for by differences between the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> trimester and between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters ( $p < 0.01$ ; Dunn's multiple comparison test) (Figure 4B). During the 2<sup>nd</sup> pregnancy of subject TV715 (TV715b), there was a statistically significant decline in the length of the V1V2 loop ( $p = 0.0028$ ; Kruskal-Wallis test), which was explained by the difference between 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> trimesters and between 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters ( $p < 0.05$ ; Dunn's multiple comparison test). However, in contrast with TV715a, there was no statistically significant change in the number of PNGS throughout this subject's 2<sup>nd</sup> pregnancy ( $p = 0.6480$ ; Kruskal-Wallis test). Overall, both median V1V2 length and median numbers of PNGS were higher in the 1<sup>st</sup> pregnancy than in the 2<sup>nd</sup> one, with differences involving values observed in the 3<sup>rd</sup> trimester of the first pregnancy being the most salient ( $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis test;  $p < 0.01$ , Dunn's multiple comparison test) (Figure 4A and 4B). Such differences were not observed in subject TV1261 (data not shown).

### **DISCUSSION**

In this study, the evolution of coreceptor tropism determinants in the V1-V3 segment of the HIV-1 *env* gene was examined during the course of pregnancy in 19 women. Prediction of coreceptor tropism using G2P<sub>5.75</sub> signalled the presence of X4-capable variants in 9 of 19



study subjects independent of HIV-1 subtype. This prediction was confirmed using PSSM<sub>X4R5</sub> in 6 of 9 subjects, and using recombinant phenotypic assay in 4 of 9 subjects. Thus, a concordance of 84.2% was found between G2P<sub>5.75</sub> and PSSM<sub>X4R5</sub>, similar to what was reported by Seclen *et al.*, although that particular study was performed using bulk sequences and a G2P false positive rate of 10%.<sup>38</sup> CD4<sup>+</sup> T cell counts were lower in X4 than in R5 subjects and 6/9 X4 subjects exhibited CD4 counts  $\leq$  200, consistent with the fact that X4 variants are predominantly found in advanced HIV disease.<sup>43</sup> As the time from seroconversion was unknown for all study participants, the possibility that X4 subjects were infected for a longer duration of time than R5 subjects cannot be ruled out.

Moreover, progressive and significant evolution of coreceptor tropism determinants in V1, V2, and V3 regions (G2P FPR; PSSM score; net charge of V3; V2 likelihood index; length of V1V2; number of PNGS in V1V2), as well as the increased frequency of X4-capable sequences observed over time were compatible with ongoing evolution of viral coreceptor usage towards CXCR4 in 5 of 19 study subjects. The net charge of V3 is one of the main determinants of HIV-1 tropism<sup>44,45</sup> and R5 to X4 tropism switch is associated with an increase in the positive charge of V3,<sup>1,46</sup> which is necessary for electrostatic interaction between V3 and CXCR4.<sup>47</sup> In terms of evolution, the charge of V3 increased significantly during pregnancy in subjects TV643, TV715a, TV995, TV1151, and TV1261, and this by itself can attest of the ongoing evolution of coreceptor usage towards CXCR4. These results are in agreement with Mild *et al.*,<sup>45</sup> who showed an increase in the net charge of V3 over time in switch *versus* non-switch viral populations. This increase was accompanied by a decrease in G2P FPR and an increase in PSSM<sub>X4R5</sub> scores in these subjects, consistent with accumulation of X4-related mutations in V3 over time. Furthermore, increasing proportions of X4-capable sequences with time were predicted by G2P<sub>5.75</sub> and PSSM<sub>X4R5</sub> in 4 of these subjects. In 3 cases (TV643, TV715a, and TV1261), predicted X4 sequences were present as early as the 1<sup>st</sup> trimester. In two of them (TV643 and TV715), frequencies of X4-capable sequences increased progressively through pregnancy to reach 100% in the 3<sup>rd</sup> trimester. In one subject infected with subtype D (TV995), X4 sequences appeared in the 3<sup>rd</sup> trimester but G2P FPR had already started to decrease in the 2<sup>nd</sup> trimester. In one subject infected with subtype A1 (TV1151), the frequency of X4-capable sequences was close to 100% throughout pregnancy while G2P FPR,

PSSM scores, and the net charge of V3 showed statistically significant evolution towards X4 tropism. In addition, recombinant phenotypic assay testing revealed that subject TV1151 was a carrier of dual-mixed virus throughout pregnancy. Taken together, these observations indicate that even when all sequences analyzed are predicted to be X4-capable, evolution of viral tropism determinants can continue, perhaps reflective of increased affinity/avidity for CXCR4.<sup>48</sup> Finally, shifting from dual-mixed to R5 tropism was observed during the course of this study, but only once in the 24 pregnancies that were analyzed (TV1217). All X4 subjects were treated with combination antiretroviral therapy, consistent with the lack of interdependence between antiretroviral treatment, evolution of viral tropism determinants, and coreceptor switching.<sup>49</sup>

Mounting evidence supports the involvement of V2 in determining coreceptor tropism.<sup>4,6</sup> Similar to V3, the net charge of V2 was higher in X4 subjects, but no evolution of net charge over time was observed. V2 likelihood indexes were computed to monitor the evolution of amino acid substitutions in V2 sequences. Calculations based on a reference dataset showed that the V2 index is higher in X4 variants than in R5 variants. Similar to a PSSM score, the V2 likelihood index reflects the relative frequency of X4-related substitutions in a given V2 sequence. However, as the association between V2 amino acid sequences and tropism is weaker than for V3, thus establishing a threshold value for tropism prediction is impractical.<sup>6</sup> Nonetheless, V2 indexes increased with the progression of pregnancy in the same subjects (*i.e.* TV643, TV715a, TV995, TV1151) who showed significant evolution of V3 features associated with CXCR4 usage (G2P FPR, PSSM scores, net charge of V3). On the whole, these results indicate that the presence of amino acid substitutions consistent with evolution of coreceptor tropism towards CXCR4 can be observed in V2. However, whether these mutations are directly responsible for a switch in phenotype is still unclear. They could also represent gain-of-fitness mutations that compensate for fitness losses induced by other amino acid substitutions that are directly responsible for coreceptor switching, as previously discussed by Pastore *et al.*<sup>5</sup>

It is well-established that the length of V1V2 and the number and pattern of PNGS within gp120 impact HIV-1 tropism, phenotype, and disease progression.<sup>45,50,51</sup> In addition, previous

studies have suggested that lengthening of V2 may be transiently required for R5 to X4 switch.<sup>52,53</sup> One explanation for the lower incidence of X4 variants within clade C is that conformational constraints in V3 limit adaptation to CXCR4.<sup>54</sup> It was also proposed that extensive *env* mutations, particularly in V1V2, must take place for clade C viruses to use CXCR4, and that additional compensatory mutations outside of V3 are required to maintain viral fitness.<sup>55</sup> Lengthening of V1V2, which was observed in two X4 subjects infected with clade C but not in R5 subjects, is characteristic of coreceptor switch in clade C and correlates with the number of PNGS.<sup>55,56</sup> It is thought that Env sequences, hence coreceptor tropism, can evolve in response to immune pressure.<sup>21,57</sup> Heavy glycosylation contributes to the efficacy of viral infection,<sup>58</sup> but it is also helpful to evade immune surveillance.<sup>59,60</sup> In addition to conformational constraints, it is possible that the V3 region of X4 variants from clade C is more susceptible to antibody neutralization than the V3 of R5 variants.<sup>61</sup> Therefore, lengthening of V1V2 and addition of PNGS could serve to shield V3 and increase viral fitness.<sup>62,63</sup>

While an earlier study reported the evolution of HIV-1 coreceptor usage from CCR5 to CXCR6 during pregnancy,<sup>25</sup> ours is the first to document evidence by G2P and PSSM of tropism switching from R5 to R5/X4 and R5/X4 to X4, and to provide evidence of evolution towards CXCR4 usage among women infected with viral isolates belonging to a wide variety of HIV-1 clades. Particular attention was paid to a subtype C-infected subject (TV715), in whom evolution of coreceptor tropism over the course of two successive pregnancies was accompanied by a dramatic increase in the length of V1V2 and in the number of PNGS peaking in the 3<sup>rd</sup> trimester of the first pregnancy, followed by a significant decline during the course of the second pregnancy. Overall, these results provide substantiation for the known transmission of X4 variants from mother to child during the course of pregnancy.<sup>12-16,64</sup>

Why should pregnancy induce changes in viral tropism? Are these changes specifically driven by immune or environmental conditions unique to pregnancy, or does this simply reflect a general trend towards X4 evolution in the context of disease progression? Pregnancy is associated with significant modulations in maternal immune responses that are thought to play an essential role in the maintenance of tolerance to paternal alloantigens expressed by the

foetus.<sup>65</sup> Normal pregnancy is associated with increased total Ig synthesis, particularly of IgG.<sup>66,67</sup> These levels decline with progression of pregnancy, due in part to maternofetal IgG transfer that takes place at an accelerating rate towards the end of gestation via receptor-mediated transplacental transport.<sup>68,69</sup> These complex changes, that take place at the level of immunoregulation, continue to be incompletely understood.<sup>70</sup> Dramatic increase in the length of variable loops in HIV-1 Env was associated with vigorous humoral immune response during primary infection.<sup>60</sup> Thus, it is possible that observed changes reflect modulations of HIV-specific antibody responses that are associated with initiation and/or progression of pregnancy, including up-regulation of Th2 responses.<sup>22-24,65,71-73</sup> Indeed, many antibody-mediated autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, flare up during pregnancy.<sup>74</sup> One could thus speculate that emergence of X4 variants was linked to active, pregnancy-associated remodelling of HIV-specific antibody response.

Alternatively, coreceptor switching could result from the general inhibition of cell-mediated immune responses which is associated with establishment and maintenance of foetomaternal tolerance.<sup>24,68</sup> Case in point, depletion of CD8<sup>+</sup> T cells in rhesus macaques infected with R5 and X4 SHIV recombinants leads to rapid re-emergence of the X4 variant, suggesting that CD8<sup>+</sup> T cells are responsible for keeping replication of X4 variants under control, and, conversely, that impairment of this response directs coreceptor switching.<sup>21</sup> While depletion of CD20<sup>+</sup> B cells did not lead to coreceptor switching in this system,<sup>75</sup> treatment with progestin-based contraceptives did result in the preferential replication of X4 variants.<sup>76</sup> On the whole, results from the present study are compatible with a model in which evolution of tropism determinants would be actively driven, or accelerated, by immune selective pressures exerted by differential HIV-specific immune responses associated with initiation and/or progression of pregnancy.

However, some features of the present study should temper these interpretations. First and foremost, limitations in sample size prevented longitudinal characterization of humoral and cell-mediated HIV-specific immune responses in study participants. In addition, although multiple time points were analyzed during pregnancy, no samples could be obtained before

and after pregnancy. Thus, it was not possible to analyze the potential influence that initiation and termination of pregnancy per se could have on coreceptor tropism.

To our knowledge, this is the first study to provide evidence of evolution of tropism towards the utilisation of CXCR4 during the course of pregnancy. Taken together, these results inform viral population dynamics and provide insights into maternal immunity that could lead to a better understanding of HIV pathogenesis and MTCT. Concordance between tropism prediction algorithms, various structural and physiochemical properties of gp120 variable loops, and recombinant phenotypic assays strongly supports the validity of these observations. It is possible that these observations reflect changes in selective pressures on HIV-1 envelope resulting from modulation of immune response associated with the initiation and/or progression of pregnancy, although we cannot exclude that tropism determinants evolved in a manner similar to or indistinguishable from that seen in non-pregnant subjects. Although safety and pharmacokinetics data are currently insufficient to recommend the use of maraviroc in pregnancy,<sup>77</sup> coreceptor tropism testing should be performed in case such usage is ever considered.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Doris G. Ransy performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. Alena Motorina, Natacha Merindol, and Bertine S. Akouamba performed experiments. Johanne Samson was the coordinator of the CMIS Mother-Child Cohort. Yolanda Lie and Laura Napolitano performed experiments and wrote the manuscript. Normand Lapointe and Marc Boucher provided access to study subjects and wrote the manuscript. Hugo Soudeyns designed the study, supervised experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. The authors wish to thank Silvie Valois and Martine Caty for technical assistance. The authors also thank the Monogram Biosciences Clinical Reference Laboratory for performance of all Trofile<sup>®</sup> and Trofile<sup>®</sup> DNA assays. Supported by grants from the CIHR-Health Canada Research Initiative on HIV-AIDS (grant n<sup>o</sup> HOP-75352) and by an infrastructure grant from le Réseau SIDA-maladies infectieuses of le Fonds de la recherche du Québec-santé (FRQ-S) to H.S. L.A.N. and Y.L. are employees of Monogram Biosciences. N.M. was the recipient of scholarships from Fondation CHU Sainte-Justine, FRQ-S, and the Cole Foundation.

## SEQUENCE DATA

All sequence data was deposited in GenBank (accession numbers KF038436-KF039675).

## AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

The authors have no competing financial interests.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. Clinical parameters in X4 and R5 subjects.**

CD4<sup>+</sup> T cell counts (A),  $\Delta$ CD4 (B), and HIV-1 viral load (C) were measured in X4 and R5 subjects as described under Materials and Methods. Horizontal lines, boxes and whiskers represent the median, interquartile range and range of values, respectively. Statistical significance of differences between groups was tested using the Mann-Whitney *U* test.

### **Figure 2. Evolution of V3 loop sequences during pregnancy in X4 and R5 subjects.**

G2P FPR (A), PSSM<sub>X4R5</sub> scores (B) and the net charge of V3 (C) were calculated on every sequence in X4 (left panel) and R5 (right panel) subjects, and distributions were plotted for 1<sup>st</sup> (black boxes), 2<sup>nd</sup> (gray boxes), and 3<sup>rd</sup> (white boxes) trimesters of pregnancy. Dots represent outlier values. Tropism prediction cut-offs for each parameter are represented as dashed lines, as described under Materials and Methods. Statistical significance of differences between trimesters was tested using the Mann-Whitney *U* test.  $p \leq 0.05$ : \*;  $p \leq 0.01$ : \*\*;  $p \leq 0.001$ : \*\*\*.

### **Figure 3. V2 likelihood index in R5 and X4 isolates and evolution during pregnancy.**

V2 likelihood index was calculated for 52 X4 and 185 R5 V2 sequences of clade A, B, C and D retrieved from the Los Alamos National Laboratory HIV Sequence Database<sup>42</sup> (A) and for each of the 1240 HIV-1 *env* sequences obtained from our study group (B), as described under Materials and Methods. Distribution of the V2 likelihood index was plotted for the 1<sup>st</sup> (black boxes), 2<sup>nd</sup> (gray boxes), and 3<sup>rd</sup> (white boxes) trimesters of pregnancy for X4 (left panel) and R5 (right panel) subjects (C). Statistical significance of differences between trimesters was tested using the Mann-Whitney *U* test.  $p \leq 0.05$ : \*;  $p \leq 0.01$ : \*\*;  $p \leq 0.001$ : \*\*\*.

**Figure 4. Evolution of the length of the VIV2 loop and number of potential N-linked glycosylation sites (PNGS) during 2 consecutive pregnancies in HIV-1 subtype C-infected subject TV715.**

The length in amino acids (A) and the number of PNGS (B) were calculated for each sequence and are shown for each time point. Statistical significance of differences between time points was tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test.  $p \leq 0.05$ : \*;  $p \leq 0.01$ : \*\*;  $p \leq 0.001$ : \*\*\*.

**REFERENCES**

1. Coetzer M, Cilliers T, Ping LH, Swanstrom R, and Morris L: Genetic characteristics of the V3 region associated with CXCR4 usage in HIV-1 subtype C isolates. *Virology* 2006;356(1-2):95-105.
2. Zhang H, Tully DC, Zhang T, Moriyama H, Thompson J, and Wood C: Molecular determinants of HIV-1 subtype C coreceptor transition from R5 to R5X4. *Virology* 2010;407(1):68-79.
3. Boyd MT, Simpson GR, Cann AJ, Johnson MA, and Weiss RA: A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J Virol* 1993;67(6):3649-3652.
4. Hoffman NG, Seillier-Moiseiwitsch F, Ahn J, Walker JM, and Swanstrom R: Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol* 2002;76(8):3852-3864.
5. Pastore C, Nedellec R, Ramos A, Pontow S, Ratner L, and Mosier DE: Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations. *J Virol* 2006;80(2):750-758.

6. Thielen A, Sichtig N, Kaiser R, Lam J, Harrigan PR, and Lengauer T: Improved prediction of HIV-1 coreceptor usage with sequence information from the second hypervariable loop of gp120. *J Infect Dis* 2010;202(9):1435-1443.
7. Dunfee RL, Thomas ER, Wang J, Kunstman K, Wolinsky SM, and Gabuzda D: Loss of the N-linked glycosylation site at position 386 in the HIV envelope V4 region enhances macrophage tropism and is associated with dementia. *Virology* 2007;367(1):222-234.
8. Carrillo A, and Ratner L: Human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-lymphoid cell lines: role of the V3 loop and C4 envelope determinants. *J Virol* 1996;70(2):1301-1309.
9. Soudeyns H, and Pantaleo G: The moving target: mechanisms of HIV persistence during primary infection. *Immunol Today* 1999;20(10):446-450.
10. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, *et al.*: Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(21):7552-7557.
11. Chalmet K, Dauwe K, Foquet L, *et al.*: Presence of CXCR4-using HIV-1 in patients with recently diagnosed infection: correlates and evidence for transmission. *J Infect Dis* 2012;205(2):174-184.
12. Ometto L, Zanchetta M, Mainardi M, *et al.*: Co-receptor usage of HIV-1 primary isolates, viral burden, and CCR5 genotype in mother-to-child HIV-1 transmission. *AIDS* 2000;14(12):1721-1729.
13. Salvatori F, and Scarlatti G: HIV type 1 chemokine receptor usage in mother-to-child transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17 (10):925-935.



14. Huang W, Eshleman SH, Toma J, *et al.*: Vertical transmission of X4-tropic and dual-tropic HIV-1 in five Ugandan mother-infant pairs. *AIDS* 2009;23(14):1903-1908.
15. Duri K, Soko W, Gumbo F, *et al.*: Genotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences: bioinformatics prediction of coreceptor usage among 28 infected mother-infant pairs in a drug-naive population. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27(4):411-419.
16. Crudeli CM, Aulicino PC, Rocco CA, Bologna R, Mangano A, and Sen L: Relevance of early detection of HIV type 1 SI/CXCR4-using viruses in vertically infected children. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012;28(7):685-692.
17. Richman DD, and Bozzette SA: The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994;169(5):968-974.
18. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, and Landau NR: Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997;185(4):621-628.
19. Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, *et al.*: The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol* 2003;77(7):4449-4456.
20. Kaleebu P, Nankya IL, Yirell DL, *et al.*: Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45(1):28-33.
21. Harouse JM, Buckner C, Gettie A, *et al.*: CD8<sup>+</sup> T cell-mediated CXC chemokine receptor 4-simian/human immunodeficiency virus suppression in dually infected rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(19): 10977-10982.

22. Tranchot-Diallo J, Gras G, Parnet-Mathieu F, *et al.*: Modulations of cytokine expression in pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 1997;37(3):215-226.
23. Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, and Kim CE: T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chem Immunol Allergy* 2005;88:64-79.
24. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, and Mosmann TR: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14(7):353-356.
25. Tscherning-Casper C, Vodros D, Menu E, *et al.*: Coreceptor usage of HIV-1 isolates representing different genetic subtypes obtained from pregnant Cameroonian women. European Network for In Utero Transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;24(1):1-9.
26. Cavarelli M, Scarlatti G: HIV-1 co-receptor usage: influence on mother-to-child transmission and pediatric infection. *J Transl Med* 2011;9 Suppl 1:S10.
27. Calvert C, Ronsmans C: The contribution of HIV to pregnancy-related mortality: a systematic review and meta-analysis. *AIDS* 2013 [Epub ahead of print].
28. Akouamba BS, Viel J, Charest H, *et al.*: HIV-1 genetic diversity in antenatal cohort, Canada. *Emerg Infect Dis* 2005;11(8):1230-1234.
29. Trouplin V, Salvatori F, Cappello F, *et al.*: Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J Virol* 2001;75(1):251-259.
30. Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24(8):1596-1599.

31. Gaschen B, Kuiken C, Korber B, and Foley B: Retrieval and on-the-fly alignment of sequence fragments from the HIV database. *Bioinformatics* 2001;17(5):415-418.
32. Raymond S, Saliou A, Nicot F, *et al.*: Frequency of CXCR4-using viruses in primary HIV-1 infections using ultra-deep pyrosequencing. *AIDS* 2011;25(13):1668-1670.
33. Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, *et al.*: Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* 2003;77(24):13376-13388.
34. Zhang M, Gaschen B, Blay W, *et al.*: Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* 2004;14(12):1229-1246.
35. Cooper DA, Heera J, Goodrich J, *et al.*: Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naive subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2010;201(6):803-813.
36. Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, *et al.*: Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(2):566-575.
37. Chapman D, Lie Y, Paquet A, *et al.*: Tropism determinations derived from cellular DNA or plasma virus compartments are concordant and predict similar maraviroc treatment outcomes in an antiretroviral treatment experienced cohort. XIX International AIDS Conference, July 22-27, 2012, Washington, DC, USA. Poster THPE070.
38. Seclen E, Soriano V, Gonzalez MM, Gomez S, Thielen A, Poveda E: High concordance between the position-specific scoring matrix and Geno2pheno algorithms for

genotypic interpretation of HIV-1 tropism: V3 length as the major cause of disagreement. *J Clin Microbiol* 2011;49(9):3380-3382.

39. Kagan RM, Johnson EP, Siaw M, *et al.*: A genotypic test for HIV-1 tropism combining Sanger sequencing with ultradeep sequencing predicts virologic response in treatment-experienced patients. *PLoS One* 2012;7(9):e46334.

40. Kagan RM, Johnson EP, Siaw MF, *et al.*: Comparison of genotypic and phenotypic HIV type 1 tropism assay: Results from the screening samples of Cenicriviroc Study 202, a randomized phase II trial in treatment-naive subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013 [Epub ahead of print].

41. Knapp DJ, McGovern RA, Dong W, *et al.*: Factors influencing the sensitivity and specificity of conventional sequencing in human immunodeficiency virus type 1 tropism testing. *J Clin Microbiol* 2013;51(2):444-451.

42. <http://www.hiv.lanl.gov/>.

43. Berger EA, Murphy PM, Farber JM: Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999;17:657-700.

44. De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J: Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 1992;66(11):6777-6780.

45. Mild M, Kvist A, Esbjornsson J, Karlsson I, Fenyo EM, Medstrand P: Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection. *Infect Genet Evol* 2010;10(3):356-364.

46. Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, *et al.*: Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 1992;66(5):3183-3187.
47. Kwong PD, Wyatt R, Sattentau QJ, Sodroski J, Hendrickson WA.: Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* 2000;74(4):1961-1972.
48. Stalmeijer EH, Van Rij RP, Boeser-Nunnink B, *et al.*: In vivo evolution of X4 human immunodeficiency virus type 1 variants in the natural course of infection coincides with decreasing sensitivity to CXCR4 antagonists. *J Virol* 2004;78(6):2722-2728.
49. Saracino A, Monno L, Cibelli DC, *et al.*: Co-receptor switch during HAART is independent of virological success. *J Med Virol* 2009;81(12):2036-2044.
50. Groenink M, Fouchier RA, Broersen S, *et al.*: Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration. *Science* 1993;260(5113):1513-1516.
51. Jansson M, Backstrom E, Scarlatti G, *et al.*: Length variation of glycoprotein 120 V2 region in relation to biological phenotypes and coreceptor usage of primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17(15):1405-1414.
52. Fouchier RA, Broersen SM, Brouwer M, *et al.*: Temporal relationship between elongation of the HIV type 1 glycoprotein 120 V2 domain and the conversion toward a syncytium-inducing phenotype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11(12):1473-1478.
53. Schuitemaker H, Fouchier RA, Broersen S, *et al.*: Envelope V2 configuration and HIV-1 phenotype: clarification. *Science* 1995;268(5207):115.

54. Patel MB, Hoffman NG, Swanstrom R. Subtype-specific conformational differences within the V3 region of subtype B and subtype C human immunodeficiency virus type 1 Env proteins. *J Virol* 2008;82(2):903-916.
55. Coetzer M, Nedellec R, Cilliers T, Meyers T, Morris L, Mosier DE. Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011;56(1):9-15.
56. Dash PK, Siddappa NB, Mangaiarkarasi A, *et al.*: Exceptional molecular and coreceptor-requirement properties of molecular clones isolated from an Human Immunodeficiency Virus Type-1 subtype C infection. *Retrovirology* 2008;5:25.
57. Frost SD, Wrin T, Smith DM, *et al.*: Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(51):18514-18519.
58. Ly A, Stamatatos L. V2 loop glycosylation of the human immunodeficiency virus type 1 SF162 envelope facilitates interaction of this protein with CD4 and CCR5 receptors and protects the virus from neutralization by anti-V3 loop and anti-CD4 binding site antibodies. *J Virol* 2000;74(15):6769-6776.
59. Sagar M, Wu X, Lee S, Overbaugh J. Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J Virol* 2006;80(19):9586-9598.
60. Bunnik EM, Pisas L, van Nuenen AC, Schuitemaker H. Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2008;82(16):7932-7941.
61. Bunnik EM, Quakkelaar ED, van Nuenen AC, Boeser-Nunnink B, Schuitemaker H. Increased neutralization sensitivity of recently emerged CXCR4-using human

immunodeficiency virus type 1 strains compared to coexisting CCR5-using variants from the same patient. *J Virol* 2007;81(2):525-531.

62. Losman B, Bolmstedt A, Schonning K, *et al.*: Protection of neutralization epitopes in the V3 loop of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 by N-linked oligosaccharides in the V1 region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17(11):1067-1076.

63. Pinter A, Honnen WJ, He Y, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Kayman SC. The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J Virol* 2004;78(10):5205-5215.

64. Scarlatti G, Hodara V, Rossi P, Muggiasca L, Buccheri A, Albert J, Fenyö EM: Transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from mother to child correlates with viral phenotype. *Virology* 1993;197(2):624-629.

65. Billingham RE, Brent L, and Medawar PB: Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953;172(4379):603-606.

66. Bisset LR, Fiddes TM, Gillett WR, Wilson PD, Griffin JF. 1990. Altered humoral immunoregulation during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1990;23:4-9.

67. Wilson R, Maclean MA, Jenkins C, Kinnane D, Mooney J, Walker JJ. Abnormal immunoglobulin subclass patterns in women with a history of recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2001;76:915-917.

68. Brambell FW, Halliday R, Brierley J, Hemmings WA. Transference of passive immunity from mother to young. *Lancet* 1954;266:964-965.

69. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003;21:3365-3369.

70. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 2011;241:20-38.
71. Lichtenstein M. Tuberculin reaction in tuberculosis during pregnancy. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* 1942;48:89-93.
72. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;15(3):713-718.
73. Narita M, Yamada S, Kikuta H, Togashi T. Reconstitution of humoral immunity during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2000;44(3):148-152.
74. Garsenstein M, Pollak VE, Kark RM. Systemic lupus erythematosus and pregnancy. *N Engl J Med* 1962;267:165-169.
75. Tasca S, Zhuang K, Gettie A, *et al.*: Effect of B-cell depletion on coreceptor switching in R5 simian-human immunodeficiency virus infection of rhesus macaques. *J Virol* 2011;85(7):3086-3094.
76. Trunova N, Tsai L, Tung S, *et al.*: Progestin-based contraceptive suppresses cellular immune responses in SHIV-infected rhesus macaques. *Virology* 2006;352(1):169-177.
77. Panel on Treatment of HIV-Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. Recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1-infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV transmission in the United



| Subjects | HIV-1 subtype | Country of origin | Gestational age (weeks) | ARV therapy | CD4 count (cells/mm3) | CD8 count (cells/mm3) | Viral load (log <sub>10</sub> RNA copies/ml) | Number of clones | Fraction of X4-capable sequences (%) |                      |         |
|----------|---------------|-------------------|-------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|--|------------------|--------------------------------------|----------------------|---------|
|          |               |                   |                         |             |                       |                       |  |                  | G2P <sub>5.75</sub>                  | PSSM <sub>X4R5</sub> | Tropism |
| TV479a   | B             | Canada            | 13                      | —           | 125                   | 240                   | 4.50   | 22               | 13.6                                 | 0.00                 | R5      |
|          |               |                   | 20                      | AZT-3TC     | 192                   | 234                   | 2.70*  | 20               | 5.00                                 | 0.00                 | R5      |
|          |               |                   | 31                      | AZT-3TC     | 279                   | 378                   | 2.70*  | 29               | 13.8                                 | 0.00                 | R5      |
| TV479b   |               |                   | -26                     | —           | 110                   | 180                   | 4.70   | 24               | 0.00                                 | 0.00                 | R5      |
|          |               |                   | 8.5                     | d4T-3TC     | 270                   | 470                   | 3.69   | 24               | 4.17                                 | 0.00                 | R5      |
|          |               |                   | 25                      | d4T-3TC     | 338                   | 663                   | 3.73   | 12               | 0.00                                 | 0.00                 | nt      |
| TV643    | B             | Haiti             | 13                      | —           | 350                   | 480                   | 4.27   | 19               | 47.4                                 | 42.1                 | DM      |
|          |               |                   | 24                      | AZT-3TC     | 408                   | 636                   | 4.03   | 18               | 77.8                                 | 77.8                 | DM      |
|          |               |                   | 38                      | AZT-3TC-NVP | 260                   | 550                   | 4.68   | 26               | 100                                  | 100                  | DM      |
| TV669    | B             | Canada            | 13                      | None        | 510                   | 765                   | 4.78   | 23               | 100                                  | 0.00                 | R5      |
|          |               |                   | 22                      | AZT-3TC-NFV | 555                   | 675                   | 2.81   | 23               | 100                                  | 0.00                 | R5      |
|          |               |                   | 35                      | AZT-3TC-NFV | 578                   | 815                   | 2.70*  | 23               | 100                                  | 0.00                 | R5      |
| TV715a   | C             | Congo             | 11                      | —           | 10                    | 730                   | 5.33   | 20               | 45.0                                 | 45.0                 | nd      |
|          |               |                   | 16                      | AZT-3TC-NFV | 51                    | 1,224                 | 2.18   | 21               | 85.7                                 | 85.7                 | nd      |
|          |               |                   | 39                      | AZT-3TC     | 120                   | 1,752                 | 2.88   | 36               | 100                                  | 97.2                 | nd      |
| TV715b   |               |                   | 11                      | AZT-3TC     | 208                   | 1,872                 | 4.23   | 20               | 100                                  | 100                  | nd      |
|          |               |                   | 26                      | d4T-3TC-NVP | 190                   | 1,292                 | 4.21   | 21               | 100                                  | 95.2                 | nd      |
|          |               |                   | 32                      | d4T-3TC-NVP | 200                   | 1,8                   | 4.77   | 19               | 100                                  | 100                  | nd      |
| TV995    | D             | Congo             | 15                      | AZT-3TC-NVP | 540                   | 1,04                  | 2.50   | 12               | 0.00                                 | 0.00                 | nt      |
|          |               |                   | 23                      | AZT-3TC-NVP | 496                   | 768                   | 2.41   | 30               | 0.00                                 | 0.00                 | nt      |
|          |               |                   | 37                      | AZT-3TC-NVP | 260                   | 715                   | 1.70*  | 10               | 70.0                                 | 70.0                 | DM      |

|        |        |          |    |                     |     |       |      |    |      |      |    |
|--------|--------|----------|----|---------------------|-----|-------|------|----|------|------|----|
| TV1151 | A1     | Rwanda   | 14 | —                   | 154 | 627   | 4.84 | 24 | 91.7 | 100  | DM |
|        |        |          | 26 | NFV-AZT-3TC         | 165 | 671   | 3.20 | 19 | 100  | 100  | nd |
|        |        |          | 34 | NFV-AZT-3TC         | 156 | 744   | 2.70 | 15 | 93.3 | 100  | DM |
| TV1203 | CRF-13 | Congo    | 10 | LPV/r-ddI-3TC       | 70  | 720   | 3.96 | 30 | 0.33 | 3.33 | nd |
|        |        |          | 19 | LPV/r-ddI-3TC       | 90  | 1,125 | 4.14 | 21 | 4.76 | 9.52 | nd |
|        |        |          | 32 | LPV/r-ddI-3TC       | 91  | 858   | 1.95 | 11 | 0.00 | 9.09 | nd |
| TV1217 | B      | Haiti    | 16 | ABC-3TC-NFV-<br>RTV | 184 | 456   | 5.07 | 18 | 16.7 | 0.00 | DM |
|        |        |          | 21 | ABC-3TC-NFV-<br>RTV | 225 | 495   | 4.81 | 21 | 9.52 | 0.00 | R5 |
|        |        |          | 32 | ABC-3TC-NFV-<br>RTV | 190 | 570   | 4.59 | 16 | 0.00 | 0.00 | R5 |
| TV1261 | C      | Zimbabwe | 12 | AZT                 | 120 | 852   | 4.58 | 23 | 17.4 | 39.1 | R5 |
|        |        |          | 25 | AZT-3TC-NFV         | 90  | 700   | 1.71 | 24 | 4.17 | 12.5 | nd |
|        |        |          | 35 | AZT-3TC-NFV-<br>NVP | 153 | 1,19  | 3.84 | 11 | 63.6 | 63.6 | R5 |

**Table 1. Clinical data and tropism prediction in X4 subjects.**

HIV-1 subtype, gestational age, absolute CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts, HIV-1 viral load, fraction of CXCR4-capable sequences, and tropism were determined as described under Materials and Methods. a and b denote 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> consecutive pregnancies in a given subject. AZT: zidovudine; 3TC: lamivudine; d4T: stavudine; ddI: didanosine; ABC: abacavir; NVP: nevirapine; NFV: nelfinavir; RTV: ritonavir; LPV/r: ritonavir-boosted lopinavir; R5: CCR5 tropism; DM: dual-mixed tropism; -: not treated; nd: not determined; nt: not tested. Asterisks denote the lower limit of detection of the viral load detection method.

| <b>Subjects</b> | <b>HIV-1 subtype</b> | <b>Country of origin</b> | <b>Gestational age (weeks)</b> | <b>ARV therapy</b> | <b>CD4 counts (cells/mm<sup>3</sup>)</b> | <b>CD8 counts (cells/mm<sup>3</sup>)</b> | <b>Viral load (log<sub>10</sub> RNA copies/ml)</b> | <b>Number of clones</b> |
|-----------------|----------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------|--|--|--|-------------------------|
| TV481a          | B                    | Haiti                    | -17                            | —                  | 980                                      | 1,176                                    | 4.19   | 7                       |
|                 |                      |                          | 4.8                            | —                  | 648                                      | 810                                      | 4.16   | 7                       |
|                 |                      |                          | 29                             | AZT-3TC            | 805                                      | 1,035                                    | 3.70   | 5                       |
| TV481b          |                      |                          | 19                             | AZT-3TC            | 572                                      | 1,21                                     | 4.97   | 5                       |
|                 |                      |                          | 24                             | AZT-3TC-NFV        | 544                                      | 765                                      | 3.30   | 3                       |
|                 |                      |                          | 34                             | AZT-3TC-NFV        | 754                                      | 1,188                                    | 3.67   | 1                       |
| TV805           | B                    | Haiti                    | 13                             | —                  | 66                                       | 117                                      | 4.29   | 19                      |
|                 |                      |                          | 20                             | AZT-3TC-NFV        | 270                                      | 306                                      | 2.07   | 12                      |
|                 |                      |                          | 37                             | AZT-3TC-NFV        | 320                                      | 208                                      | 3.05   | 9                       |
| TV823           | B                    | Canada                   | 7.2                            | AZT-3TC-NFV        | 286                                      | 676                                      | 3.17   | 16                      |
|                 |                      |                          | 24                             | AZT-IDV-ABC        | 210                                      | 460                                      | 1.87   | 13                      |
|                 |                      |                          | 28                             | AZT-IDV-ABC        | 234                                      | 360                                      | 1.70*  | 9                       |
| TV895           | B                    | Canada                   | 14                             | —                  | 360                                      | 900                                      | 4.48   | 10                      |
|                 |                      |                          | 23                             | AZT-3TC-NFV        | 528                                      | 990                                      | 1.87   | 9                       |
|                 |                      |                          | 33                             | AZT-3TC-NFV        | 810                                      | 1,269                                    | 1.70*  | 1                       |
| TV1005          | B                    | Canada                   | 11                             | —                  | 198                                      | 468                                      | 4.18   | 24                      |
|                 |                      |                          | 21                             | AZT-ddI-LPV/r      | 216                                      | 344                                      | 2.52   | 19                      |
|                 |                      |                          | 37                             | AZT-ddI-LPV/r      | 180                                      | 441                                      | 2.41   | 28                      |
| TV1011          | B                    | Haiti                    | 14                             | —                  | 36                                       | 486                                      | 4.49   | 24                      |
|                 |                      |                          | 28                             | AZT-3TC-NFV        | 99                                       | 616                                      | nd   | 19                      |
|                 |                      |                          | 38                             | AZT-3TC-NFV        | 90                                       | 560                                      | 3.91   | 21                      |
| TV1021a         | C                    | Congo                    | 11                             | EFV-AZT-3TC        | 300                                      | 810                                      | 3.75   | 17                      |

|         |   |         |     |                         |     |       |       |    |
|---------|---|---------|-----|-------------------------|-----|-------|-------|----|
|         |   |         | 26  | AZT-3TC-ABV-<br>NFV-RTV | 476 | 867   | 2.08  | nd |
|         |   |         | 33  | EFV-AZT-3TC             | 480 | 720   | 1.70* | nd |
| TV1021b |   |         | 9.2 | —                       | 200 | 1,3   | 4.02  | 12 |
|         |   |         | 28  | AZT-3TC-NFV             | 242 | 1,628 | 2.03  | 25 |
|         |   |         | 39  | AZT-3TC-NFV             | 255 | 1,122 | 1.70* | 19 |
| TV1161  | C | Zambia  | 8   | —                       | 285 | 855   | 4.10  | 21 |
|         |   |         | 23  | AZT-3TC-NFV             | 418 | 1,159 | 1.88  | 22 |
|         |   |         | 37  | AZT-3TC-NFV             | 400 | 1,28  | 1.70* | 24 |
| TV1263  | C | Burundi | 10  | —                       | 260 | 1,34  | 3.60  | 15 |
|         |   |         | 21  | AZT-3TC-NFV             | 330 | 1,518 | 1.70* | nd |
|         |   |         | 35  | AZT-3TC-NFV             | 384 | 1,608 | 1.70* | nd |
| TV1267a | C | Congo   | 6   | —                       | 500 | 1,06  | 3.81  | 23 |
|         |   |         | 23  | —                       | 650 | 1,456 | 3.90  | 24 |
|         |   |         | 33  | —                       | 468 | 936   | 3.99  | 24 |
| TV1267b |   |         | 11  | —                       | 594 | 1,21  | 4.00  | 23 |
|         |   |         | 19  | —                       | 494 | 1,026 | 3.94  | 22 |
|         |   |         | 34  | —                       | 513 | 1,083 | 4.05  | 23 |

**Table 2. Clinical data in R5 subjects.**

HIV-1 subtype, gestational age, absolute CD4+ and CD8+ T cell counts, and HIV-1 viral load were determined as described under Materials and Methods. a and b denote 1st and 2nd consecutive pregnancies in a given subject. AZT: zidovudine; 3TC: lamivudine; d4T: stavudine; ddI: didanosine; ABC: abacavir; IDV: indinavir; NVP: nevirapine; NFV: nelfinavir; RTV: ritonavir; LPV/r: ritonavir-

boosted lopinavir; R5: CCR5 tropism; DM: dual-mixed tropism; -: not treated; nd: not determined; nt: not tested. Asterisks denote the lower limit of detection of the viral load detection method

| Amino acid substitution | Frequency in R5 viruses (%) | Frequency in X4 viruses (%) | Log likelihood ratio |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| I161A                   | 8.05                        | 1.10                        | -1.99                |
| S164V                   | 4.24                        | 10.9                        | +0.95                |
| S164E                   | 55.1                        | 30.8                        | -0.58                |
| I165L                   | 40.3                        | 25.3                        | -0.47                |
| R166I                   | 1.27                        | 7.70                        | +1.81                |
| R166K                   | 12.0                        | 2.00                        | -1.79                |
| V169T                   | 0.42                        | 13.2                        | +3.45                |
| V169K                   | 45.3                        | 25.3                        | -0.58                |
| Y173Y                   | 72.5                        | 54.9                        | -0.28                |
| Y173H                   | 14.4                        | 27.5                        | +0.65                |
| Y177Y                   | 96.6                        | 89.0                        | -0.08                |
| I182E                   | 1.27                        | 7.69                        | +1.80                |
| I184L                   | 24.2                        | 13.2                        | -0.60                |
| S/T190X                 | 13.0                        | 39.0                        | +1.09                |
| S/T190R/K               | 4.00                        | 23.0                        | +1.75                |
| Y191X                   | 3.00                        | 15.0                        | +1.61                |
| K192R                   | 87.3                        | 68.1                        | -0.25                |
| K192I                   | 5.93                        | 15.4                        | +0.95                |
| S195N                   | 69.1                        | 45.1                        | -0.43                |
| S195H                   | 2.54                        | 15.4                        | +1.80                |

**Supplemental Table 1. Table of differential frequencies of amino acid substitutions found in V2 as a function of viral tropism.**

Log likelihood ratios were computed as described under Materials and Methods based on data from Hoffman *et al.*<sup>6</sup> and Thielen *et al.*<sup>8</sup> Amino acid positions are numbered according to sequence of HXB2.<sup>54</sup>

**Figure 1.**

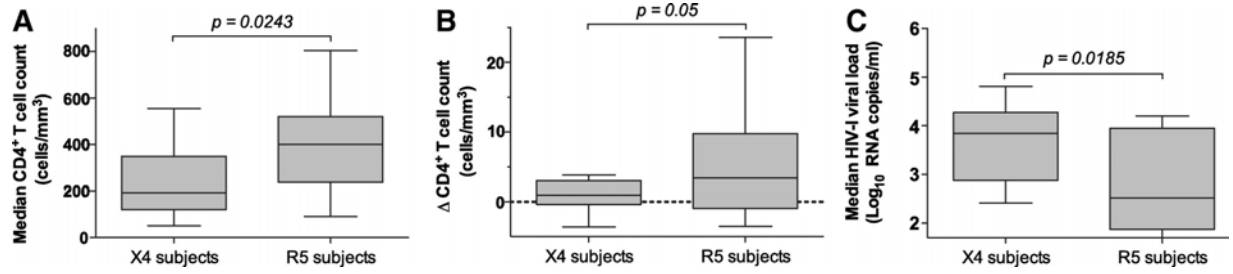


Figure 2.

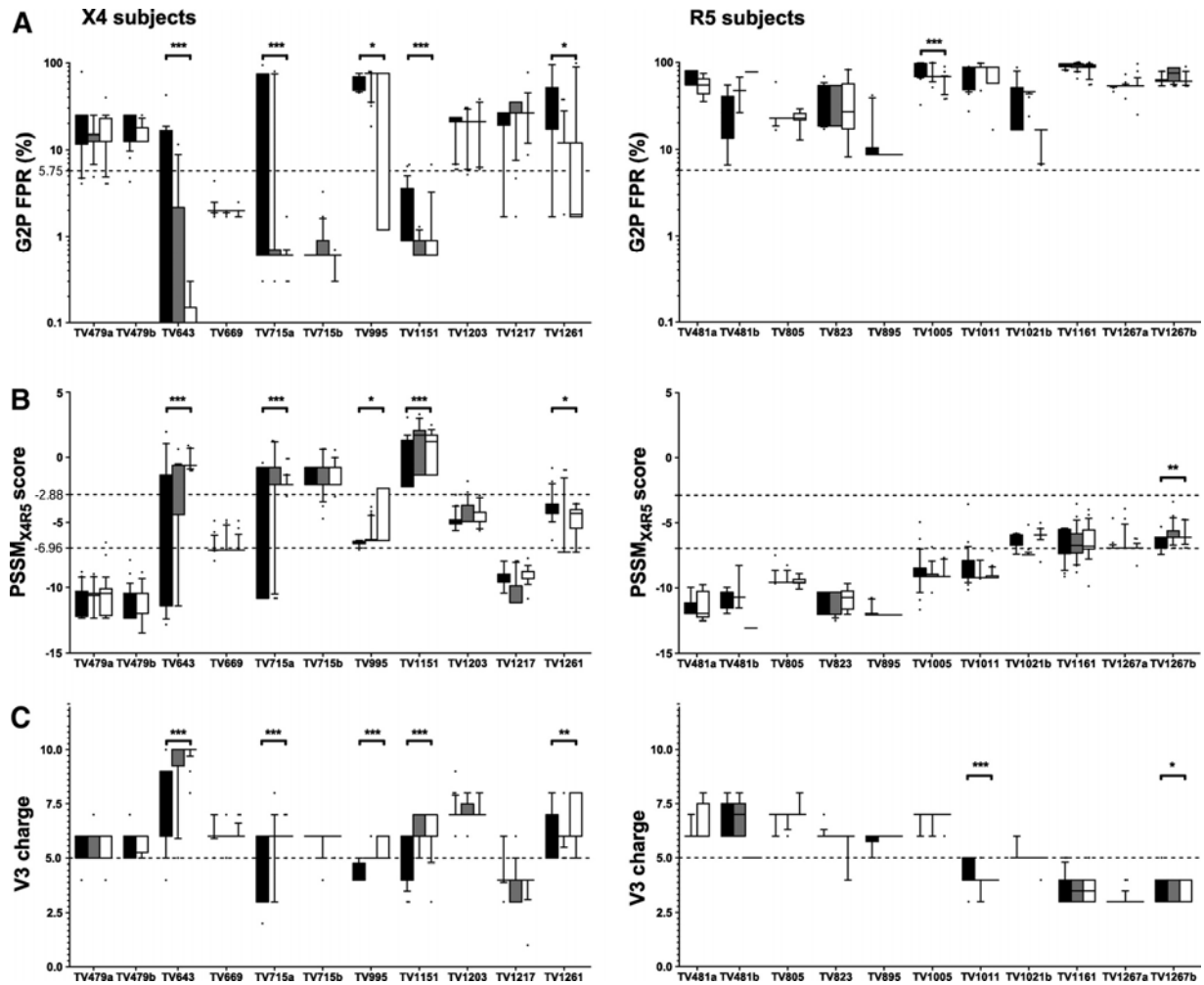




Figure 3.

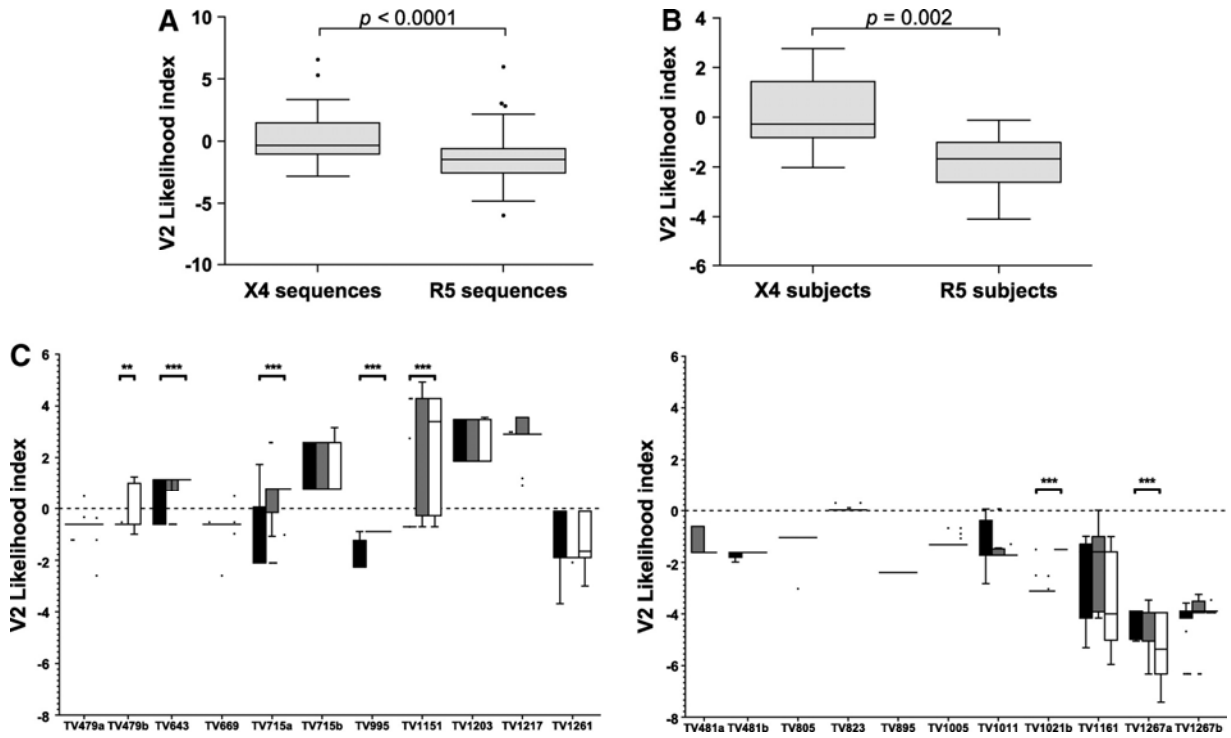
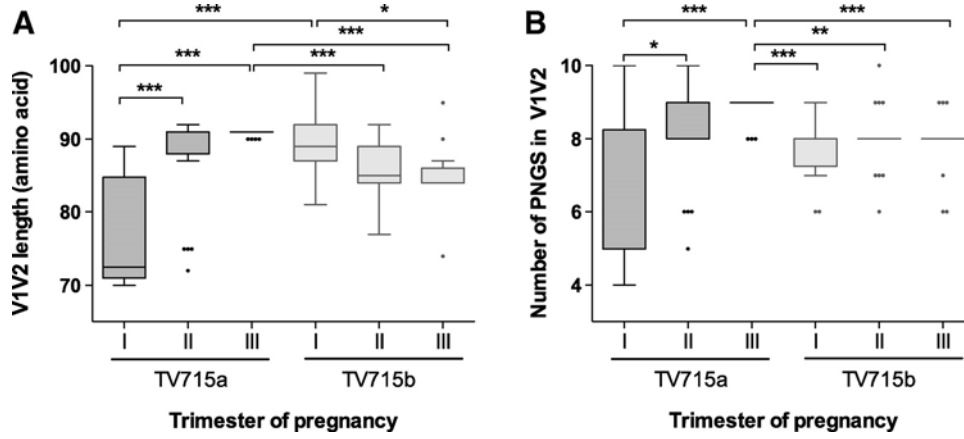


Figure 4.



## TRANSITION 1

Au cours chapitre précédent, nous avons démontré que le tropisme du VIH-1 évoluait en grossesse de l'utilisation de CCR5 vers l'utilisation de CXCR4 et avons émis l'hypothèse que les changements immunitaires associés à la grossesse favorisent ce switch du tropisme.

Les changements immunitaires au cours de la progression de la maladie mais également les différences dans la vitesse de progression de la maladie entre individus, peuvent être observables dans la pression sélective exercée sur le gène de l'enveloppe du VIH-1 (Lemey *et al.* 2007; Ross and Rodrigo 2002a; Strunnikova *et al.* 1998; Williamson 2003).

Nous émettons donc l'hypothèse que les changements immunitaires associés à la grossesse peuvent également être observables en analysant la pression sélective exercée sur le gène de l'enveloppe, et pourraient à terme expliquer une évolution vers un tropisme X4 en grossesse.

Au cours du chapitre suivant, nos objectifs seront donc les suivants :

- Décrire la pression sélective sur le gène de l'enveloppe chez les femmes enceintes.
- Comparer la pression sélective exercée sur le gène de l'enveloppe, entre femmes enceintes et non-enceintes.
- Décrire l'évolution de la pression sélective au cours de la grossesse.

**CHAPITRE II : DIFFERENCES SUBTILES DANS LA  
PRESSION SELECTIVE EXERCÉE SUR LE GENE DE  
L'ENVELOPPE CHEZ LES FEMMES ENCEINTES ET  
NON-ENCEINTES**

## Résumé

La grossesse est associée à des modulation de l'immunité maternelle contribuant à l'établissement et au maintien de la tolérance materno-foetale. Afin de comprendre si et comment ces altérations impactent l'immunité antivirale, une analyse crosse-sectionnelle détaillée de la pression sélective exercée sur les séquences de l'enveloppe du VIH-1 a été réalisée chez un groupe de femmes enceinte (n=31) ou non-enceintes (n=29) en absence de traitement antirétroviral.

Notre analyse a dévoilé 39 sites positivement sélectionnés (PS) à de fortes fréquences chez les femmes enceintes et non-enceintes qui étaient invariablement localisés à la surface du trimère d'enveloppe. La grande majorité de ces sites se retrouvaient dans les épitopes reconnus par les anticorps Env-spécifiques ou dans des sires associés au développement d'anticorps à réactivité croisée. La fréquence de sélection positive par site était plus faible chez les femmes enceintes que chez les femmes non-enceintes. De plus, l'examen de la distribution des sites positivement sélectionnés a révélé 4 positions (L134, D137, R308, and S347) qui différaient de façon significative entre les 2 groupes. Dans une étude longitudinale d'un groupe de femmes enceintes traitées, un déclin de 1,61 sites PS par trimestre de grossesse a été observé.

En somme, ces résultats indiquent que la grossesse est associée à des changements subtiles mais significatifs de la pression sélective exercée sur le VIH-1, changements qui sont compatibles avec des modulations de l'immunité maternelle.

# **SUBTLE DIFFERENCES IN SELECTIVE PRESSURES APPLIED ON THE ENVELOPE GENE OF HIV-1 IN PREGNANT VERSUS NON-PREGNANT WOMEN.**

Doris G. Ransy,<sup>a,b</sup> Etienne Lord,<sup>c</sup> Martine Caty,<sup>a,d</sup> Normand Lapointe,<sup>d,e</sup> Marc Boucher,<sup>e,f</sup> Abdoulaye Baniré Diallo,<sup>c</sup> Hugo Soudeyns,<sup>a,b,e,#</sup>

Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada<sup>a</sup>; Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada<sup>b</sup>; Department of Computer Science, Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada<sup>c</sup>; Centre maternel et infantile sur le SIDA, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada<sup>d</sup>; Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada<sup>e</sup>; Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada<sup>f</sup>.

Running head: Selective Pressures on HIV-1 During Pregnancy.

## **ABSTRACT**

Pregnancy is associated with modulations of maternal immunity that contribute to foetomaternal tolerance. To understand whether and how these alterations impact antiviral immunity, a detailed cross-sectional analysis of selective pressures exerted on HIV-1 envelope amino-acid sequences was performed in a group of pregnant (n=31) or non-pregnant (n=29) HIV-infected women in absence of treatment with antiretroviral therapy (ART). To draw a general picture of the selection applied on the envelope and compensate for inter-individual variations, a binomial test was performed on selection frequency data pooled from pregnant and non-pregnant subjects. This analysis uncovered 39 positions exhibiting statistically

significant frequency of selection that invariably mapped to the surface of the Env protein, with the great majority located within epitopes recognized by Env-specific antibodies or sites associated with the development of cross-reactive neutralizing activity. The median frequency of occurrence of positive selection per site was significantly lower in pregnant versus non-pregnant subjects, accounted in large part by a reduced median frequency of positive selection per site in the C2 subregion. Furthermore, examination of the distribution of positively selected sites using a hypergeometric test revealed that only 4 positions (L134, D137, R308, and S347) significantly differed between the 2 groups. In a separate longitudinal analysis of a group of pregnant ART-treated women, a decline of 1.61 positively selected sites per trimester of gestation was observed. Taken together, these results indicate that pregnancy is associated with subtle yet significant changes in selective pressures exerted on HIV-1 that are compatible with transient modulations of maternal immunity.

## **IMPORTANCE**

Pregnancy has traditionally been associated with a state of relative immunosuppression, which would account for the more serious clinical course and/or severity of several particular infectious diseases in pregnant women, including malaria, listeriosis, and infection with influenza virus, varicella-zoster virus, or hepatitis E virus. This alleged immunosuppression, which is thought to contribute to foetomaternal tolerance, is also thought to underlie the transient exacerbation or remission of autoimmune disorders that are observed during pregnancy. The present study asks the question whether HIV-specific antiviral immune responses are similarly affected by pregnancy by comparing the diversity and evolution of the HIV-1 envelope gene in pregnant versus non-pregnant HIV-infected women. Results indicate that the selective regimen applied on the primary amino acid sequence on Env during pregnancy is qualitatively different from that observed in non-pregnant women, but that these differences are subtle and generally incompatible with broad pregnancy-associated suppression of HIV-specific antiviral immunity.

## INTRODUCTION

Women of childbearing age represent more than 50% of individuals infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) worldwide (1). A significant proportion of these HIV-infected women will experience pregnancy at some point during their lifetime. Pregnancy is associated with changes in maternal immune responses that are thought to be associated with the establishment of materno-foetal tolerance (2). Indeed, cell-mediated immunity (Th1) is down-regulated during pregnancy while humoral immune responses (Th2) are up-regulated, leading to aggravated outcomes of viral infections (3) and flaring-up of antibody-mediated autoimmune diseases (4). However, whether initiation and progression of pregnancy influence the course of HIV disease is still debated. While some have suggested that pregnancy accelerated disease progression towards acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and reduced survival time (5-7), others have found no effect or even beneficial effects of pregnancy on HIV-associated outcomes (8-12). In addition, although a lot of attention has been focused on the biological and immunological characteristics of viruses transmitted from mother to child and on paediatric HIV infection, little is known regarding the evolution of HIV-1 itself during pregnancy.

The broad intra-patient genetic variability of HIV-1 results from the high error rate of the viral reverse transcriptase and rapid turnover of viral particles during infection (13-16). It has been hypothesized that the adaptive evolution of HIV-1 to the host cellular environment is mainly attributable to immune-mediated positive (or diversifying) selection exerted on the amino acid sequence of viral proteins (17,18). Positive selection can be estimated based on an excess of non-synonymous substitutions (amino acid replacement) over synonymous (silent) substitutions within a given gene or gene segment (19). Positive selection has been detected in many HIV-1 genes (20). This is particularly apparent in the case of gp120 and gp41 Env proteins, which are subjected to selective pressures exerted by both cell mediated and humoral immune responses in the host (17,18,21,22). It has been shown that selective pressures exerted on the *env* gene correlate with the severity of HIV disease, compatible with the level of selection applied on the HIV-1 genome being reflective of the immunologic status of the subject (17,18). Indeed, subjects in late stage HIV infection and rapid progressors exert lower



levels of selective pressure on HIV-1 genes than what is observed in the earlier stages of the disease, as well as in long-term non-progressors (LTNP) and in elite controllers (23,24). In addition, there is evidence that selective pressure on C2 through V5 regions correlates with the progression to AIDS in pediatric HIV infection (25). As pregnancy is associated with particular modulations of maternal immune responses, we hypothesized that selective pressures applied on viral gene products during pregnancy might be different from what has been described in non-pregnant states. To test this hypothesis, a detailed cross-sectional analysis of selective pressures exerted on HIV-1 envelope amino-acid sequences was performed in a group of pregnant women in absence of treatment with antiretroviral therapy (ART) and in a group of non-pregnant ART-naïve women. In a separate analysis, the evolution of selective pressures during the course of gestation was examined prospectively in a group of ART-treated women. This detailed study revealed that pregnancy was associated with higher genetic diversity and lower selective pressure in *env* and that a decline in the number of positively selected sites was observable with progression of gestation in ART-treated subjects.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Study subjects.** Seventeen pregnant women infected with HIV-1 were selected among participant to the « Centre maternel et infantile sur le SIDA » (CMIS) mother-child cohort (CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada). Three of these subjects were followed during 2 consecutive pregnancies (20 pregnancies total). Detailed clinical and socio-demographic information on these study subjects were reported elsewhere (26). Plasma was isolated by centrifugation from whole blood samples obtained by venipuncture in the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy, which were defined as 1-13, 14-28, and 29-41 weeks of gestation, respectively. In 2 of 20 pregnancies, the patient (TV1267) refused treatment, while in 11 of 20 pregnancies; ART was initiated after the first time point (*i.e.* the patient was ART-naïve at the 1<sup>st</sup> time point). HIV-1 RNA was extracted from plasma samples using the QIAamp viral extraction mini kit (Qiagen) and a 945 base pair DNA fragment spanning the Env V1-V3 region (positions 6430-7374 of HXB2) was amplified as previously described (26,27). This fragment also included the C-terminal region of C1 and the N-terminal region of C3 (21 and

17 amino acid residues, respectively). PCR products were visualized on agarose gels, purified and cloned into TOPO TA (Invitrogen). A mean of 20 independently-obtained plasmid clones per time point (1180 sequences total) were randomly selected for automated (Sanger) DNA sequencing (ABI 3730xl, Applied Biosystems; Plateforme de séquençage et de génotypage des genomes, CRCHUL, Quebec, Quebec, Canada). A total of 1180 *env* gene sequences were obtained (GenBank accession numbers KF038436-KF038566; KF038595-KF039148; KF039166-KF039521; KF039537-KF039675). Full informed consent was obtained from all study participants. Standardized clinical follow-up, including ART, was offered to all women and their children. This research protocol was conducted according to the guidelines of the Ethics Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada, where participants were enrolled and the study was completed.

In addition, intra-patient sets of sequences from pregnant and non-pregnant female subjects were retrieved from the Los Alamos HIV Sequence Database (28). Inclusion criteria were (i) sequences included the same *env* regions as above; (ii) sequences were derived from plasma; (iii) the subject was in the chronic or asymptomatic stage of HIV disease; (iv) the datasets were comprised of a minimum of 9 sequences, corresponding to the minimal size of the datasets obtained in subjects from the CMIS cohort; and (v) the subject was antiretroviral naïve. Datasets from 19 pregnant subjects (278 sequences total) and from 29 non-pregnant subjects (678 sequences total) that matched these inclusion criteria were retrieved from the database and were included in the analysis. Clinical data, references and accession numbers for all subjects are presented in Supplemental Table 1.

**Multiple sequence analyses.** HIV-1 *env* sequences were grouped according to patient and trimester. Nucleotide sequence alignment was carried out using the ClustalW accessory embedded in MEGA5 (29). Sequences were manually edited and realigned with the Hmmer version 2.32 tool implemented in Gene Cutter to improve subsequent amino acid translation (28). Duplicate sequences and those containing frame stop codons were removed. Numbers and locations of potential N-linked glycosylation sites (PNGS) were determined using N-GlycoSite (30). Sequence diversity was analyzed based on pairwise nucleotide distances (p-distance) computed using MEGA5.

**Selective pressure assessment.** To compute overall selective pressure across regions of the envelope, the number of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) and the number of synonymous substitutions per synonymous site (dS) averaged over all sequence pairs were computed for each patient and time point in MEGA5, using the Nei-Gojobori method with Jukes-Cantor correction (29,31). The dN/dS ratios ( $\omega$ ) were subsequently calculated. A  $\omega > 1$  was indicative of positive or diversifying selection, while  $\omega < 1$  denoted negative or purifying selection. However, since a single estimate of selection across the sequence span may mask individual sites under strong negative or positive selection, site by site selection was also examined. To do so, maximum likelihood trees for each sequence sets were inferred using PhyML version 3.0 (32) with the HKY substitution matrix and 100 bootstrap replicates. Phylogenetic trees and sequences were submitted to PAML CODEML version 4.4 to identify codons under positive selection (33). This program employs several models of codon substitution that allow variable  $\omega$  values among sites in order to test the hypothesis of diversifying selection (34). Among those models, null models M0, M1, and M7 do not allow for the existence of positively selected sites because values of  $\omega$  are either fixed or bounded between 0 and 1, whereas alternative models M2, M3, and M8 account for positive selection by using parameters that estimate  $\omega > 1$ . Likelihood ratio tests (LRT) were performed to compare nested models (M0 *versus* M2, M1 *versus* M3, and M7 *versus* M8) in order to test the significance of the alternative models (with a degree of freedom equivalent to the difference in the numbers of parameters between models). A significant LRT ( $p < 0.05$ ) and a  $\omega > 1$  were taken as evidence of diversifying selection. Codons with  $\omega > 1$  with a posterior probability  $> 95\%$  were considered as sites experiencing diversifying selection. Sites identified by models M2 and M8 were similar, whereas M3 tended to overestimate the number of positively selected sites, as previously shown (34-36). In this study, we focused on the results from the M8 model for clarity purposes. Sites experiencing selection were reported based on nucleotide positions corresponding to the HXB2 reference sequence, whereas selected sites located in length polymorphic regions that were longer than that of HXB2 were collapsed to the adjacent HXB2 position. Positively selected sites were mapped onto the 3D structure of gp120 (ID: PDB3J5M [37]) using The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7 (Schrödinger, LLC).

**Human leucocyte antigen typing and prediction of epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes.** Human leucocyte antigen (HLA) typing was performed using the line-probe assay (Innogenetics). For each subject, the presence and location of potential cognate cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes were inferred based on the Los Alamos Immunology Database (38).

**Statistical analysis.** Normality of data distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test when the sample size was  $n > 7$ . In the case of normal distribution, data were expressed as mean and range, and Student's *t*-test and one-way ANOVA with the Bonferroni multiple comparisons test were used to test the significance of between-groups comparisons. Paired *t*-test and repeated-measures ANOVA were used for paired data. Where distribution deviated from normal and for samples size  $\leq 7$ , data were expressed as median and interquartile range (IQR), and significance of between-group comparisons was assessed using the Mann-Whitney *U* test and the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test. The Wilcoxon signed-rank test and the Friedman test were used for paired data. Relationships between variables were tested using Spearman's rank correlation test. *p* values  $< 0.05$  were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using Excel (Microsoft Corporation), GraphPad Prism 4 (GraphPad Software), SPSS version 20 (IBM SPSS Statistics) and custom programs.

**Identification of significantly selected sites.** After identifying for each patient the sites that were positively selected, we combined the sites for all the patients in a binary two dimensional matrix  $M (N \times L)$  where  $N$  corresponds to the number of patients and  $L$  the length of analyzed *env* regions. In this matrix, 1 corresponds to a positively selected site and 0 corresponds to a non-selected site for a given patient and site position. Let *p* be the probability that a given patient in a given column is a positively selected site. We computed a *p*-value for a column of  $M$  with  $K$  selected patients to be significantly selected as the cumulative binomial probability of observing at least  $K$  selected patients given *p*. The *p*-value was computed as follows:

$$p - value = \sum_{i=K}^N \binom{N}{i} p^i (1-p)^{N-i}$$

**Identification of significantly selected sites for a defined subset of patients.** To identify if in a given site (containing K selected patients), a patient subset (*e.g.* pregnant patients) of size n ( $n < N$ ) with k ( $k < K$ ) selected patients contains a statistically significant over-representation of positively selected sites for this subset, we computed a *p*-value as a cumulative hypergeometric probability of observing at least k ( $k \leq K$ ) positively selected sites in a given subset of size n from the overall patients N. Note that this *p*-value is identical to computing one-tailed Fisher's exact test. The *p*-value was computed as follows:

$$p - value = \sum_{i=k}^K \frac{\binom{K}{i} \binom{N-K}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

The sites with *p*-value  $< 0.05$  were retained as sites exhibiting statistically significant selection. It is important to note that the under-representation of selected sites among a given group could be computed by replacing the bound of the summation in the binomial and hypergeometric formulas with one from 0 to k.

## RESULTS

**Clinical characteristics of study subjects.** The present study comprises 2 analyses: a) a comparative cross-sectional analysis between pregnant and non-pregnant ART-naïve subjects; and b) a longitudinal analysis of subjects from the CMIS cohort who were treated with ART during pregnancy. Subjects were stratified in 3 groups (Table 1). Group 1 (untreated pregnant subjects;  $n = 31$ ) includes pregnant women for whom HIV sequences were retrieved from the Los Alamos HIV database and pregnant women from the CMIS cohort in whom samples were obtained before the initiation of ART (untreated time points in the 1<sup>st</sup> trimester of gestation;  $n = 13$ ). Group 2 (untreated non-pregnant subjects;  $n = 29$ ) includes non-pregnant women for whom HIV sequences were retrieved from the Los Alamos HIV database (28). Sequences and data from subjects belonging to Group 1 and Group 2 were used in the cross-sectional

analyses (see below). Group 3 (treated pregnant subjects;  $n = 16$ ) includes pregnant subjects from the CMIS cohort who were followed prospectively for the entire duration of their pregnancy (all treated and untreated time points in the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of gestation) (Table 1; Supplemental Table 1). Subject TV1267, who refused treatment during both her pregnancies, was not included in Group 3. In the majority of cases, no clinical data were available relative to subjects whose sequences were retrieved from the Los Alamos HIV Sequence Database (28). Thus, absolute CD4<sup>+</sup> T cells counts were available in 21 of 31 (67.7%) subjects from Group 1 and in 15 of 29 (51.7%) subjects from Group 2, and viral loads were available in 61.2% (19/31) and 93.1% (27/29) of subjects from Groups 1 and 2, respectively. Median absolute CD4<sup>+</sup> T cell counts were lower in subjects from Group 1 than in subjects from Group 2 (236.5 cells per mm<sup>3</sup> [IQR = 94.00-397.5] *versus* 337.0 cells per mm<sup>3</sup> [IQR = 262.0-438.0];  $p = 0.0495$ ). Median HIV-1 viral load was lower in subjects from Group 1 but that difference was not statistically significant (4.530 log<sub>10</sub> RNA copies per ml plasma [IQR = 4.203-5.140] *versus* 4.720 log<sub>10</sub> RNA copies per ml plasma [IQR = 4.130-4.960];  $p = 0.7387$ ) (Table 1). In subjects from Group 3, median HIV-1 viral load decreased significantly during the course of pregnancy ( $p = 0.0005$ ; Wilcoxon signed rank test), consistent with introduction or intensification of ART (Table 1). Absolute CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts both increased with the progression of pregnancy, and these increases were statistically significant ( $p = 0.0207$  and  $p = 0.0428$ , respectively) (Table 1).

**Sequence diversity and rates of nucleotide substitutions in untreated pregnant and non-pregnant subjects.** To compare HIV-1 genetic diversity between pregnant and non-pregnant subjects, we first assessed intra-host nucleotide diversity in subjects from Group 1 and Group 2. Parameters that were examined include nucleotide p-distance, dS and dN. All 3 parameters were strongly correlated with one another ( $r^2 \geq 0.851$ ,  $p < 0.0001$ ) (data not shown) and were significantly higher in pregnant than in non-pregnant subjects ( $p < 0.0078$ ) (Figure 1). p-distance, dN and dS were all independent of HIV-1 subtype ( $r \leq 0.227$ ,  $p \geq 0.074$ ) (data not shown).

**Overall selective pressure in untreated pregnant and non-pregnant subjects.** To investigate overall selective pressure,  $\omega$  was averaged across the *env* gene segment spanning

regions C1 to C3 (nucleotide positions 6552-7268 of HXB2) as well as in individual gene segments encoding discrete Env protein subregions. Lower  $\omega$  values were observed in subjects from Group 1 (pregnant) as opposed to Group 2 (non-pregnant), with median values of 0.74 (IQR = 0.56-0.95) and 0.91 (IQR = 0.60-1.31), respectively, although this did not reach statistical significance ( $p = 0.1892$ ) (Figure 2A). Median  $\omega$  values were  $< 1$ , compatible with general conservation of the *env* gene in absence of strong purifying selection. Differential levels of selective pressure applied on different Env subregions displayed similar yet non-identical patterns in subjects from Group 1 as compared to Group 2 (Figure 2B). In both groups,  $\omega$  values were significantly lower in constant regions C1 and C2 than in V1, V2, V3 and C3, compatible with comparatively lower levels of selective pressure in C1 and C2. Hierarchy of selection was as follows:  $C3 > V1 > V3 > V2 > C2 > C1$  and  $V2 > V1 > V3 > C3 > C2 > C1$  in Groups 1 and Group 2, respectively. These hierarchies were not significantly different from one another ( $r = 0.657$ ;  $p = 0.175$ ) (data not shown).

Selective pressure exerted on each individual subregion of Env was then compared in a pairwise manner between the 2 groups. We found that selective pressure applied on C2 was significantly lower in pregnant subjects (median  $\omega = 0.3224$  [IQR = 0.1480-0.4208]) as compared to non-pregnant subjects (median  $\omega = 0.5029$  [IQR = 0.2850-0.9042];  $p = 0.0072$ ) (Figure 2C). The other regions of Env displayed similar levels of selection between the 2 groups (Figure 2C). The above results were independent of HIV-1 subtype, as a)  $\omega$  values were not correlated to the subtype ( $r^2 \leq 0.045$ ;  $p \geq 0.139$ ); and b)  $\omega$  values were similar in subjects infected with subtypes B, C or D regardless of pregnancy status ( $p = 0.6541$ ) (data not shown).

### **Mapping of positively selected codons on untreated pregnant and non-pregnant subjects.**

Since a single estimate of selection computed over a broad sequence may mask individual sites under strong negative or positive selection, the location and frequency of occurrence of positively selected codons ( $\omega > 1$  with a posterior probability  $> 95\%$ ) in the HIV-1 *env* gene were mapped in subjects from Groups 1 and 2 using a maximum likelihood method. Evidence of sites undergoing positive selection was found in 26 of 31 (83.8%) subjects from Group 1 (corresponding to 27 pregnancies) and in 27 of 29 (93.1%) subjects from Group 2. Median

numbers of 5 (IQR = 2.50-10.0) and 7 (IQR = 2.00-13.3) PS sites per subject were found in subjects from Group 1 (pregnant) and Group 2 (non-pregnant), respectively, however this difference was not statistically significant ( $p = 0.310$ ) (data not shown). The value of  $\omega$  at all PS sites was similar in both groups, with median  $\omega = 7.09$  (IQR = 5.49-8.39) in women from Group 1 and  $\omega = 6.91$  (IQR = 4.17-10.1) in women from Group 2 ( $p = 0.405$ ) (data not shown).

We first proceeded to draw a general picture of the selection applied on the envelope regardless of pregnancy status by removing the background noise due to inter-individual variations. To do so, a binomial test was performed on selection frequency data pooled from Group 1 and Group 2, and statistically significant positions (*i.e.* undergoing high frequency of selection) were retained (Figure 3A). This analysis uncovered 39 positively selected sites that were mapped to the gp120 3D structure (ID: PDB3J5M [37]) (Figure 3B). Selected codons invariably mapped to the surface of the protein, with the great majority located within epitopes known to be recognized by Env-specific antibodies or within sites that have been associated with the development of cross-reactive neutralizing activity (CrNA) (39). Selection was largely associated with PNGS and the outer domain of the envelope. Indeed, PNGS represent 20.1% of the Env fragment examined in the present study (48/239 amino acid residues) but 35.8% (14/39) of PS sites. Similarly, the outer domain represents 53.9% of the Env fragment studied (129/239 residues) but 89.7% (35/39 residues) of PS sites mapped to this domain (Figure 3). The remaining 4 sites located in the inner domain are K130 at the stem of V1V2, which was previously found to be associated to the development of CrNA (39), and T232, T236 and T240, which are located in a triple glycan tower (N230, N234, and N241) that protrudes from the inner domain and facilitates immune escape from CD4-mediated immune responses (40).

Secondly, the frequency and position of selection between the 2 groups were analyzed and compared. We found that the median frequency of occurrence of positive selection per site was significantly lower in subjects from Group 1 as opposed to Group 2 (median = 0.00% [IQR = 0.00-3.13; range = 0.00-21.88] and median = 0.00% [IQR = 0.00-3.45; range = 0.00-27.59], respectively;  $p = 0.0424$ ) (Figure 3). Of the 239 codon positions analyzed, the



proportion of Env undergoing positive selection was analogous in both groups, with 85 of 239 (35.6%) and 84 of 239 (35.1%) sites in subjects from Group 1 and Group 2, respectively. Furthermore, distribution of these positively selected sites was similar in both groups (Figure 3). Indeed, a hypergeometric test revealed that only 4 positions significantly differed between the 2 groups. Selection at 3 positions was associated with Group 2 (non-pregnant), *i.e.* L134 ( $p = 0.009$ ) and D137 ( $p = 0.018$ ) in the length polymorphic region of V1, and R308 ( $p = 0.045$ ) in the V3 loop (V3 position 13). On the other hand, selection at position S347 ( $p = 0.033$ ), located in C3, was associated with Group 1 (pregnant) (Figure 4). Amino acid residues L134, D137, and S347 were also identified in the binomial test previously performed but R308 was not (Figure 4). While the hypergeometric test showed that positions L134 and R308 were also significantly associated with subtype B ( $p = 0.0456$  and  $p = 0.0286$ , respectively), which represents 65.5% of infecting subtypes in Group 2 but only 22.6% in Group 1, position D137 and S347 were not ( $p = 0.201$  and  $p = 0.945$  respectively). Intriguingly, amino acid positions located in C2 were not put in evidence in this analysis, in contrast to results obtained when assessing overall selective pressure. However, when the frequency of selection per site was taken into account, we found that median frequency in C2 was significantly lower in subjects from Group 1 as compared to Group 2 (median = 0.00% [IQR = 0.00-3.13; range = 0.00-15.63] and median = 0.00% [IQR = 0.00-0.00; range = 0.00-20.69], respectively;  $p = 0.0253$ ). Frequencies of selection in other Env subregions were otherwise similar between the 2 groups (data not shown). To control for the influence of HIV-1 subtype, frequencies of selection were compared between subjects infected with B and C HIV-1 subtypes regardless of pregnancy status and were found not to be significantly different ( $p = 0.2301$ ) (data not shown).

Finally, the association between positively selected sites and sites encoding potential autologous CTL epitopes were investigated in subjects in whom HLA typing was performed (Group 1;  $n = 13$ ). This analysis revealed that a mean of 9.1% of positively selected sites were located within known (A-list) CTL epitopes (Figure 4) (38).

**Evolution of *env* gene genetic diversity in pregnant subjects following introduction or intensification of ART.** Subjects from Group 3 (treated pregnant subjects) were followed prospectively for the entire duration of their pregnancy (Table 1). Evolution of *env* genetic

diversity in these subjects, in terms of nucleotide p-distance, dN and dS based on a comparison between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy, revealed a decreased of all three parameters during the course of pregnancy. But this decrease was not statistically significant ( $p \geq 0.1105$ ) (Figure 5A).

**Evolution of selective pressure in pregnant subjects following ART introduction or intensification.** First, the evolution of overall selective pressure ( $\omega$ ) on *env* (nucleotide positions 6552-7268 of HXB2) as well as in individual gene segments encoding discrete Env protein subregions was examined during each trimester of pregnancy. Here again, evolution was based on a comparison between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy. We found that  $\omega$  remained stable throughout pregnancy when a) the entire *env* fragment was considered; and b) all subregions were considered separately, with the exception of V1 in which a slight but statistically significant decline was observed ( $p = 0.0140$ ) (Figure 5B). Evolution of selective pressure was further investigated by performing a site-by-site analysis for each trimester of pregnancy. The overall number of positively selected sites decreased significantly with the progression of pregnancy in subjects from Group 3, with a mean loss of 1.61 sites per trimester. Positively selected sites were lost all along the envelope sequence with no particular preference noted in terms of specific subregion (Figure 6). The number of positively selected sites per subject and in the frequency of selection per site highlight a statistically significant decline between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy ( $p = 0.0071$  and  $p < 0.0001$ , respectively) (Figure 6 and data not shown).

## DISCUSSION

Adaptive dynamics of HIV-1 involve constant evolution of viral genes under the selective pressure exerted by host humoral and cell-mediated immune responses. As pregnancy is associated with changes in qualitative and quantitative aspects of maternal immunity (2-4), it is of prime importance to better understand the effects of pregnancy on evolution of HIV-1 and on HIV disease progression.

Several genetic features of the *env* gene, including genetic diversity, dS and  $\omega$ , have been associated with the progression of HIV disease (25,41-46). For this reason, we compared intra-host nucleotide p-distances, dS and dN in pregnant (Group 1) and non-pregnant (Group 2) ART-naïve women. In cross-sectional analysis, these 3 parameters were found to be strongly correlated with one another and were significantly higher in pregnant than in non-pregnant subjects. dS was the main contributor to genetic diversity of the *env* gene, as the difference between Group 1 and Group 2 was of greater magnitude and statistical significance in the case of dS as compared to p-distances or dN. High rates of synonymous substitutions, indicative of a higher replication rate and a shorter viral generation time, have been associated with faster disease progression and immune activation (44). Heightened replication dynamics could also stem from inefficient control of viral replication brought about by progressive immunodeficiency in HIV-infected subjects, as higher levels of genetic diversity of HIV-1 were associated with late-stage disease and the onset of AIDS (47).

Elevated levels of markers of immune activation (*i.e.* frequencies of CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T cells) were reported in non-pregnant women as compared to men after adjusting for HIV-1 viral load (48). Similar observations were also made in HIV-infected and uninfected women during the course of pregnancy (49,50). Meier *et al.* proposed that these phenomena could provide an explanation for the fact that HIV disease progresses more rapidly in women compared to men, and that the underlying mechanism might be related to a positive association between progesterone levels and production of IFN- $\alpha$  by plasmacytoid dendritic cells following stimulation via TLR7/8 (48). It is possible that pregnancy, which is characterized by elevated levels of progesterone, could potentiate this phenomenon, resulting in higher replication dynamics in pregnant women. However, no differences were observed in HIV-1 viral load between Group 1 and Group 2 in the present report, and previous studies have shown that HIV-1 genetic diversity was not generally correlated with viral load (51,52).

While synonymous changes reflect mutation rate and generation time, nonsynonymous substitutions are mainly the result of selective pressure. To estimate selective pressure,  $\omega$  was computed in subjects from Group 1 and Group 2 based on the entire sequence of the C1-C3 Env segment. Results highlighted overall conservation of the *env* gene ( $\omega < 1$ ) in both groups

of subjects, compatible with a certain degree of purifying selection, which was in agreement with previous reports in non-pregnant adults and children (35,53-56).

The pattern of selection in both groups was examined in detail and exhibited that pattern of selection was equivalent in pregnant and non-pregnant women and was consistent with an antibody response applying primarily in the fragment of Env studied herein. First, the study of overall selection in Env subregions revealed similar yet non-identical hierarchies of selection. Indeed, in both groups, variable regions V1, V2 and V3, and constant region C3 showed high overall  $\omega$  as compared to constant regions C1 and C2, which displayed levels of selection that were comparable with that which is commonly seen in other HIV-1 genes, including *gag* and *pol* (35). Site-by-site analysis confirmed these results, with positively selected sites more common and frequency of selection higher in V1, V2, V3 and C3 as compared to C1 and C2 in both groups. These results indicate that distribution of selection along the Env fragment was comparable in pregnant and non-pregnant subjects. Thus, a binomial test, which eliminates inter-individual variations, was performed and revealed 39 sites that were invariably subjected to selection in both groups. Thirty-five of the 39 positively selected sites (89.7%) were located in the outer domain of Env, which is comprised of V1, V2, V3 and the regions flanking V3 in C2, as well as the  $\alpha 2$  helical region of C3. The remaining 4 sites located to the stem of V1V2 in C1 (K130) and to 3 PNGS in C2 (N276, N289, N295) that are known to protrude from the envelope spike (40). Thus, all 39 positively selected sites mapped to amino acids that are exposed at the surface of the Env trimer. Furthermore, PNGS represented 35.8% of positively selected sites. This underlines the disproportionate involvement of gp120-specific antibody responses in the selective pressure applied on the HIV-1 envelope and the association between diversifying selection in Env and the presence of PNGS (35). Indeed, N-glycans play a role in hindering antibodies from accessing critical epitopes on gp120 (35,57). In the earliest stages of HIV-1 infection, antibody responses drive the evolution of envelope sequences and promote immune escape, primarily through remodelling of the glycan shield (57-60). Lengthening and addition of N-glycans in the length polymorphic regions of V1V2 are the major contributors to the evolution of the glycan shield (58,59,61). This contribution of V1V2 was observable in our data, as V1V2 exhibited the highest concentrations and frequencies of positively selected sites, principally located in the length polymorphic regions. Although the vast majority of studies

attribute neutralizing antibody selective pressures to the early stages of infection (57,62-64), the results presented herein suggests that humoral immune responses are still the main driving force behind the envelope evolution in chronically infected subjects. This result is consistent with a recent study from Chaillon *et al.* showing that autologous neutralizing activity may still continue to increase over time more than ten years after infection (56). Interestingly, PNGS N332, that has recently been reported to be a main target of broadly neutralizing antibodies (65), was found to be selected in 3 subjects from Group 2 but none from Group 1, although this position was not highlighted in the hypergeometric test. One must keep in mind that antibody escape does not only occur in the PNGS. Indeed, a study showed ongoing selective pressure on the CD4 binding site by neutralizing antibodies after years of infection (66). Moreover, the portion of C3 analysed herein, which represents the 17 amino acid long  $\alpha$ 2-helix, was also associated with high levels of codon substitutions (56,61,67-70). These findings support the notion that latter region is commonly targeted by autologous neutralizing antibodies (67,71). Compatible with this is the fact that only 9% of positively selected sites mapped to sequences encoding potential autologous CTL epitopes in individual subjects.

N-glycans also play a role in shielding CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from accessing critical epitopes on gp120, either by direct steric hindrance or by interfering with proper processing of the epitope (35,57,72,73). Reflective of this, a region of 3 PNGS (N230, N234, N241) in the inner domain showed high frequency of selection. These residues were shown to be located just downstream of a MHC class II-restricted epitope recognized by a CD4<sup>+</sup> T cell line (40). These sites are thought to be involved in the formation of a form a « triple N-glycan tower » that facilitates immune escape without altering the primary sequence of the epitope itself (40). However, these sites also protrude from the inner domain and therefore could also be pressured by humoral immune responses.

Although pregnant and non-pregnant groups showed similar general pattern of selection, hypergeometric testing highlighted 4 positions in which frequency of selection differed significantly between the 2 groups of subjects. Indeed, L134, D137 and R308 were significantly associated with selection in non-pregnant subjects (Group 2) while S347 was associated with selection in pregnant subjects (Group 1). Positions L134 and R308 were also

associated with selection when analysis was performed in subjects infected with subtype B versus non-B. Hence, we cannot rule out that the over-representation of subtype B in Group 2 was the reason why these 2 positions were put into evidence. L134 and S347 have already been described as being involved in the induction of cross neutralizing activity, and position 137 was shown to be involved in the recognition of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer by the PGT122 broadly neutralizing monoclonal antibody (39,74,75). R308 is part of the epitope recognized by the V3 crown-specific neutralizing monoclonal antibody 10-188 (76), which can interfere with the binding of PGT121 (77). In addition, the amino acid residue at position 308 (position 13 of V3) is part of a covariation cluster that involves other V3 residues, including amino acids located at positions 11, 19 and 25 (78,79). This result suggests that pregnancy can be associated with comparatively subtle changes in the selective pressure exerted on this portion of the HIV-1 envelope glycoprotein.

When the level of selection was considered, contrary to what was seen in the pattern of selection, differences were found between pregnant and non-pregnant women. Indeed, even though this difference was not statistically significant, a lower median value of  $\omega$  in pregnant as opposed to non-pregnant women was observed. In addition, the median frequency of occurrence of positive selection per site was significantly lower Group 1 as compared to Group 2. Interestingly, selective pressure applied on C2 was significantly lower in pregnant subjects. Because of its relative magnitude, the difference between pregnant and non-pregnant women in terms of C2 selection (*i.e.* median  $\omega = 0.3224$  versus 0.5029;  $p = 0.0072$ ) goes a long way in explaining the difference in average  $\omega$  that was observed when the entire C1-C3 segment was examined. In addition, the frequency of selection in C2 was significantly lower in Group 1 as compared to Group 2. Part of C2 (amino-acid residues 197-250) is comprised within the inner domain of the gp120 envelope protein. In this subregion of C2, 9 of 54 (16.7%) and 8 of 54 (14.8%) amino acid residues were found to be under positive selection in subjects from Group 1 and Group 2, respectively. Intuitively, this would seem to suggest that the comparative lack of selective pressure exerted on C2 in pregnant *versus* non-pregnant could result from differences in HIV-specific cell-mediated immune responses rather than humoral responses. Part of C2 is located in the outer domain of gp120 (amino-acid residues 251-295), and it is in that part of the outer domain where differences in frequency of selection

between pregnant and non-pregnant are the most salient (Figure 3). In this subregion of C2, 16 of 45 (35.6%) amino acid residues were found to be under positive selection in both subjects from Group 1 and Group 2. Selected sites included 3 PNGS (N276, N289, N295). Some of the positively selected sites also involved residues that participate in the CD4 binding site (80). Solvent exposure of the C-terminal part of C2 is consistent with selective pressure resulting from humoral immune responses, although the presence of numerous MHC class I and class II-restricted T cell epitopes was also reported in this subregion (40). Taken together, these data are compatible with the existence of differential immunologic environments in the pregnant *versus* non-pregnant states, given that humoral and cell-mediated immune responses are well-established contributors to selective pressure directed against viral genes.

In the second part of the study, the evolution of selective pressures was examined prospectively as a function of progression of pregnancy. HIV-1 viral load decreased significantly during the course of gestation as a result of the introduction and/or intensification of ART. Estimates of p-distance, dN and dS also declined between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters, but this decline was not statistically significant.  $\omega$  also remained relatively stable throughout pregnancy when the entire C1-C3 Env fragment was considered. It was also stable when all subregions were considered separately, with the exception of V1, where a slight but statistically significant decline of  $\omega$  was observed. Finally, statistically significant declines in the number of positively selected sites per subject ( $p = 0.0071$ ) and in the frequency of selection per site ( $p < 0.0001$ ) were noted between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy. It is possible that reduction in the number of positively selected sites is a consequence of ART and secondary to a reduction in HIV-1 viral load leading to a decline in genetic diversity. Indeed, while the slight decrease in p-distance that was observed between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters did not reach statistical significance, it could have interfered with the detection of positively selected sites using CODEML. On the other hand, that reduced selection was related to progression of pregnancy itself cannot be excluded. Progesterone and estrogens levels increase during pregnancy to peak in the 3<sup>rd</sup> trimester (81-83). Immunosuppressive effects of high levels of these hormones on cell-mediated immune responses are well documented (84-87), possibly contributing to the systemic Th2 bias observed in pregnant women (88-91). V1 being a prime target of HIV-specific antibody responses, declining selection would also be

compatible with longitudinal changes in immunoglobulin (Ig) profiles during gestation. Normal pregnancy is associated with increased total Ig synthesis, particularly IgG (88,92). However, these levels progressively decline with progression of pregnancy, due in part to receptor-mediated transplacental transfer of all 4 IgG isotypes (IgG1>IgG4>IgG3>IgG2) that takes place at an accelerating rate towards the end of gestation (93,94). As evidenced in mice (95), it is also possible that regulatory T cell activity associated with maternofetal tolerance contributes to the down-regulation of maternal cell-mediated immune responses, resulting in the overall decline in the number of positively selected sites observed herein.

Study limitations include the fact that partial HIV-1 genomic sequences were used in the analysis. Further studies making use of full-length genomic sequences and/or single genome amplification methods would enable a more thorough characterization of selective pressures exerted on other HIV-1 gene products such as the p24 capsid protein and the p66/p51 reverse transcriptase. In addition, availability of pre-pregnancy samples would have enabled us to assess the influence of initiation of pregnancy of selective pressures, something that could not be achieved in the context of the present study.

In conclusion, the present study constitutes, to the best of our knowledge, the first description of the selective pressure regimen applied on the envelope of HIV-1 during pregnancy. Results of cross-sectional analysis revealed that differences between pregnant and non-pregnant states in terms of selection were subtle and might be related to pregnancy-associated changes in immune responsiveness at the level of both humoral and cell-mediated immune responses, possibly including antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Results of longitudinal analysis were compatible with this interpretation, as progression of pregnancy was associated with a significant decline in terms of numbers of selected sites and frequency of selection among study subjects. Understanding the genetic evolution of HIV-1 in the context of pregnancy is of particular importance due to the high prevalence of the disease among women worldwide. Taken together, results presented herein provide added evidence for the existence of pregnancy-associated immune modulation in chronic HIV-1 infection. However, these findings are reassuring in the sense that large-scale shifts in selective pressure potentially associated with major changes in terms of immunocompetence were not readily observed.



## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants to H.S. from Réseau SIDA et maladies infectieuses of le Fonds de la recherche du Québec-santé (FRQS) and from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Research Initiative (HOP-75352). A.B.D. was supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fonds de la recherche du Québec-nature et technologie (FRQNT). E.L. was an NSERC Fellow.

The authors wish to thank Silvie Valois for expert technical assistance, and Marc-André Rodrigue and Julie Lacaille for automated DNA sequencing.

## REFERENCES

1. **WHO, UNAIDS, UNICEF.** 2011. Global HIV/AIDS response, Epidemic update and health sector progress towards Universal Access.
2. **Billingham RE, Brent L, Medawar PB.** 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* **172**:603-606.
3. **Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA.** 2006. Emerging infections and pregnancy. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1638-1643.
4. **Doria A, Ghirardello A, Iaccarino L, Zampieri S, Punzi L, Tarricone E, Ruffatti A, Sulli A, Sarzi-Puttini PC, Gambari PF, Cutolo M.** 2004. Pregnancy, cytokines, and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* **51**:989-995.
5. **Kumar RM, Uduman SA, Khurrana AK.** 1997. Impact of pregnancy on maternal AIDS. *J. Reprod. Med.* **42**:429-434.
6. **Temmerman M, Chomba EN, Ndinya-Achola J, Plummer FA, Coppens M, Piot P.** 1994. Maternal human immunodeficiency virus-1 infection and pregnancy outcome. *Obstet. Gynecol.* **83**:495-501.
7. **Lieve V, Shafer LA, Mayanja BN, Whitworth JA, Grosskurth H.** 2007. Effect of pregnancy on HIV disease progression and survival among women in rural Uganda. *Trop. Med. Int. Health* **12**:920-928.

8. **Johnstone FD, Willox L, Brettle RP.** 1992. Survival time after AIDS in pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **99**:633-636.
9. **Saada M, Le Chenadec J, Berrebi A, Bongain A, Delfraissy JF, Mayaux MJ, Meyer L.** 2000. Pregnancy and progression to AIDS: results of the French prospective cohorts. SEROGEST and SEROCO Study Groups. *AIDS* **14**:2355-2360.
10. **van Benthem BH, Vernazza P, Coutinho RA, Prins M.** 2002. The impact of pregnancy and menopause on CD4 lymphocyte counts in HIV-infected women. *AIDS* **16**:919-924.
11. **Ekouevi DK, Inwoley A, Tonwe-Gold B, Danel C, Becquet R, Viho I, Rouet F, Dabis F, Anglaret X, Leroy V.** 2007. Variation of CD4 count and percentage during pregnancy and after delivery: implications for HAART initiation in resource-limited settings. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **23**:1469-1474.
12. **Tai JH, Udoji MA, Barkanic G, Byrne DW, Rebeiro PF, Byram BR, Kheshti A, Carter JD, Graves CR, Raffanti SP, Sterling TR.** 2007. Pregnancy and HIV disease progression during the era of highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **196**:1044-1052.
13. **Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA.** 1989. Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **264**:16948-16956.
14. **Mansky LM, Temin HM.** 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* **69**:5087-5094.
15. **Nowak M.** 1990. HIV mutation rate. *Nature* **347**:522.
16. **Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD.** 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**:1582-1586.
17. **Ross HA, Rodrigo AG.** 2002. Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J. Virol.* **76**:11715-11720.
18. **Williamson S.** 2003. Adaptation in the env gene of HIV-1 and evolutionary theories of disease progression. *Mol. Biol. Evol.* **20**:1318-1325.

19. **Leal E, Janini M, Diaz RS.** 2007. Selective pressures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) during pediatric infection. *Infect. Genet. Evol.* **7**:694-707.
20. **Yang W, Bielawski JP, Yang Z.** 2003. Widespread adaptive evolution in the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Mol. Evol.* **57**:212-221.
21. **Seibert SA, Howell CY, Hughes MK, Hughes AL.** 1995. Natural selection on the gag, pol, and env genes of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol. Biol. Evol.* **12**:803-813.
22. **Yamaguchi-Kabata Y, Gojobori T.** 2000. Reevaluation of amino acid variability of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein and prediction of new discontinuous epitopes. *J. Virol.* **74**:4335-4350.
23. **Canducci F, Marinozzi MC, Sampaolo M, Berrè S, Bagnarelli P, Degano M, Gallotta G, Mazzi B, Lemey P, Burioni R, Clementi M.** 2009. Dynamic features of the selective pressure on the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 CD4-binding site in a group of long term non progressor (LTNP) subjects. *Retrovirology* **6**:4.
24. **Salgado M1, Brennan TP, O'Connell KA, Bailey JR, Ray SC, Siliciano RF, Blankson JN.** 2010. Evolution of the HIV-1 nef gene in HLA-B\*57 positive elite suppressors. *Retrovirology* **7**:94.
25. **Ganeshan S, Dickover RE, Korber BT, Bryson YJ, Wolinsky SM.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. *J. Virol.* **71**:663-677.
26. **Ransy DG, Motorina A, Merindol N, Akouamba BS, Samson J, Lie Y, Napolitano LA, Lapointe N, Boucher M, Soudeyans H.** 2014. Evolution of HIV-1 coreceptor usage and coreceptor switching during pregnancy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **30**:312-324.
27. **Trouplin V, Salvatori F, Cappello F, Obry V, Brelot A, Heveker N, Alizon M, Scarlatti G, Clavel F, Mammano F.** 2001. Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J. Virol.* **75**:251-259.
28. <http://www.hiv.lanl.gov/>.

29. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**:2731-2739.
30. **Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, Korber B.** 2004. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* **14**:1229-1246.
31. **Nei M, Gojobori T.** 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**:418-426.
32. **Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O.** 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**:307-321.
33. **Yang Z.** 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1586-1591.
34. **Yang Z, Nielsen R, Goldman N, Pedersen AM.** 2000. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* **155**:431-449.
35. **Choisy M, Woelk CH, Guegan JF, Robertson DL.** 2004. Comparative study of adaptive molecular evolution in different human immunodeficiency virus groups and subtypes. *J. Virol.* **78**:1962-1970.
36. **Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z.** 2001. Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* **18**:1585-1592.
37. **Lyumkis D, Julien JP, de Val N, Cupo A, Potter CS, Klasse PJ, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Carragher B, Wilson IA, Ward AB.** 2013 Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**:1484-1490.
38. **Yusim K, Korber BTM, Brander C, Haynes BF, Koup R, Moore JP, Walker BD, Watkins DI, Editors.** 2009. HIV Molecular Immunology 2009. Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico.
39. **van den Kerkhof TL, Feenstra KA, Euler Z, van Gils MJ, Rijdsdijk LW, Boeser-Nunnink BD, Heringa J, Schuitemaker H, Sanders RW.** 2013. HIV-1 envelope

- glycoprotein signatures that correlate with the development of cross-reactive neutralizing activity. *Retrovirology* **10**:102.
40. **Li H, Xu CF, Blais S, Wan Q, Zhang HT, Landry SJ, Hioe CE.** 2009. Proximal glycans outside of the epitopes regulate the presentation of HIV-1 envelope gp120 helper epitopes. *J. Immunol.* **182**:6369-6378.
  41. **Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ, Whetsell AJ, Furtado MR, Cao Y, Ho DD, Safrit JT.** 1996. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* **272**:537-542.
  42. **Ross HA, Rodrigo AG.** 2002. Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J. Virol.* **76**:11715-11720.
  43. **Williamson S.** 2003. Adaptation in the env gene of HIV-1 and evolutionary theories of disease progression. *Mol. Biol. Evol.* **20**:1318-1325.
  44. **Lemey P, Kosakovsky Pond SL, Drummond AJ, Pybus OG, Shapiro B, Barroso H, Taveira N, Rambaut A.** 2007. Synonymous substitution rates predict HIV disease progression as a result of underlying replication dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **3**:e29.
  45. **Strunnikova N, Ray SC, Lancioni C, Nguyen M, Viscidi RP.** 1998. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 in relation to disease progression in children. *J. Hum. Virol.* **1**:224-239.
  46. **Strunnikova N, Ray SC, Livingston RA, Rubalcaba E, Viscidi RP.** 1995. Convergent evolution within the V3 loop domain of human immunodeficiency virus type 1 in association with disease progression. *J. Virol.* **69**:7548-7558.
  47. **Hill AL, Rosenbloom DI, Nowak MA.** 2012. Evolutionary dynamics of HIV at multiple spatial and temporal scales. *J. Mol. Med.* **90**:543-561.
  48. **Meier A, Chang JJ, Chan ES, Pollard RB, Sidhu HK, Kulkarni S, Wen TF, Lindsay RJ, Orellana L, Mildvan D, Bazner S, Streeck H, Alter G, Lifson JD, Carrington M, Bosch RJ, Robbins GK, Altfeld M.** 2009. Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat. Med.* **15**:955-959.

49. **Mikyas Y, Aziz N, Harawa N, Gorre M, Neagos N, Nogueira M, Wafer D, Dillon M, Boyer PJ, Bryson YJ, Plaeger S.** 1997. Immunologic activation during pregnancy: serial measurement of lymphocyte phenotype and serum activation molecules in HIV-infected and uninfected women. *J. Reprod. Immunol.* **33**:157-170.
50. **Sachdeva N, Oshima K, Cotter A, Ashman M, Davila L, Okazaki T, Inaba N, Asthana D.** 2008. Analysis of immunological markers associated with pregnancy and HIV-1 infection: relevance in perinatal transmission in HIV-1-infected pregnant women with low plasma viral load. *Am. J. Reprod. Immunol.* **60**:264-273.
51. **Bello G, Casado C, García S, Rodríguez C, del Romero J, Borderia AV, López-Galíndez C.** 2004. Plasma RNA viral load is not associated with inpatient quasispecies heterogeneity in HIV-1 infection. *Arch. Virol.* **149**:1761-1771.
52. **Maldarelli F, Kearney M, Palmer S, Stephens R, Mican J, Polis MA, Davey RT, Kovacs J, Shao W, Rock-Kress D, Metcalf JA, Rehm C, Greer SE, Lucey DL, Danley K, Alter H, Mellors JW, Coffin JM.** 2013. HIV populations are large and accumulate high genetic diversity in a nonlinear fashion. *J. Virol.* **87**:10313-10323.
53. **Carvajal-Rodríguez A, Posada D, Pérez-Losada M, Keller E, Abrams EJ, Viscidi RP, Crandall KA.** 2008. Disease progression and evolution of the HIV-1 env gene in 24 infected infants. *Infect. Genet. Evol.* **8**:110-120.
54. **Leal E, Janini M, Diaz RS.** 2007. Selective pressures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) during pediatric infection. *Infect. Genet. Evol.* **7**:694-707.
55. **Zhang H, Tully DC, Hoffmann FG, He J, Kankasa C, Wood C.** 2010. Restricted genetic diversity of HIV-1 subtype C envelope glycoprotein from perinatally infected Zambian infants. *PLoS One* **5**:e9294.
56. **Chaillon A, Braibant M, Hué S, Bencharif S, Enard D, Moreau A, Samri A, Agut H, Barin F.** 2012. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) continues to evolve in presence of broadly neutralizing antibodies more than ten years after infection. *PLoS One* **7**:e44163.
57. **Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM.** 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-312.

58. **van Gils MJ, Bunnik EM, Boeser-Nunnink BD, Burger JA, Terlouw-Klein M, Verwer N, Schuitemaker H.** 2011. Longer V1V2 region with increased number of potential N-linked glycosylation sites in the HIV-1 envelope glycoprotein protects against HIV-specific neutralizing antibodies. *J. Virol.* **85**:6986-6995.
59. **Bunnik EM, Pisas L, van Nuenen AC, Schuitemaker H.** 2008. Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **82**:7932-7941.
60. **Bar KJ, Tsao CY, Iyer SS, Decker JM, Yang Y, Bonsignori M, Chen X, Hwang KK, Montefiori DC, Liao HX, Hraber P, Fischer W, Li H, Wang S, Sterrett S, Keele BF, Ganusov VV, Perelson AS, Korber BT, Georgiev I, McLellan JS, Pavlicek JW, Gao F, Haynes BF, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM.** 2012. Early low-titer neutralizing antibodies impede HIV-1 replication and select for virus escape. *PLoS Pathog.* **8**:e1002721.
61. **Rong R, Bibollet-Ruche F, Mulenga J, Allen S, Blackwell JL, Derdeyn CA.** 2007. Role of V1V2 and other human immunodeficiency virus type 1 envelope domains in resistance to autologous neutralization during clade C infection. *J. Virol.* **81**:1350-1359.
62. **Frost SD, Wrin T, Smith DM, Kosakovsky Pond SL, Liu Y, Paxinos E, Chappey C, Galovich J, Beauchaine J, Petropoulos CJ, Little SJ, Richman DD.** 2005. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**:18514-18519.
63. **Frost SD, Liu Y, Pond SL, Chappey C, Wrin T, Petropoulos CJ, Little SJ, Richman DD.** 2005. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope variation and neutralizing antibody responses during transmission of HIV-1 subtype B. *J. Virol.* **79**:6523-6527.
64. **Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ.** 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**:4144-4149.
65. **Sok D, Doores KJ, Briney B, Le KM, Saye-Francisco KL, Ramos A, Kulp DW, Julien JP, Menis S, Wickramasinghe L, Seaman MS, Schief WR, Wilson IA,**

- Poignard P, Burton DR.** 2014. Promiscuous glycan site recognition by antibodies to the high-mannose patch of gp120 broadens neutralization of HIV. *Sci. Transl. Med.* **6**:236ra63.
66. **Wu X, Wang C, O'Dell S, Li Y, Keele BF, Yang Z, Imamichi H, Doria-Rose N, Hoxie JA, Connors M, Shaw GM, Wyatt RT, Mascola JR.** 2012. Selection pressure on HIV-1 envelope by broadly neutralizing antibodies to the conserved CD4-binding site. *J. Virol.* **86**:5844-5856.
67. **Moore PL, Ranchoe N, Lambson BE, Gray ES, Cave E, Abrahams MR, Bandawe G, Mlisana K, Abdool Karim SS, Williamson C, Morris L; CAPRISA 002 Study; NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (CHAVI).** 2009. Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in early HIV-1 subtype C infection. *PLoS Pathog.* **5**:e1000598.
68. **Rong R, Li B, Lynch RM, Haaland RE, Murphy MK, Mulenga J, Allen SA, Pinter A, Shaw GM, Hunter E, Robinson JE, Gnanakaran S, Derdeyn CA.** 2009. Escape from autologous neutralizing antibodies in acute/early subtype C HIV-1 infection requires multiple pathways. *PLoS Pathog.* **5**:e1000594.
69. **van Gils MJ, Edo-Matas D, Bowles EJ, Burger JA, Stewart-Jones GB, Schuitemaker H.** 2011. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 in a patient with cross-reactive neutralizing activity in serum. *J. Virol.* **85**:8443-8448.
70. **Moore PL, Gray ES, Choge IA, Ranchoe N, Mlisana K, Abdool Karim SS, Williamson C, Morris L; CAPRISA 002 Study Team.** 2008. The c3-v4 region is a major target of autologous neutralizing antibodies in human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J. Virol.* **82**:1860-1869.95.
71. **Gray ES, Moody MA, Wibmer CK, Chen X, Marshall D, Amos J, Moore PL, Foulger A, Yu JS, Lambson B, Abdool Karim S, Whitesides J, Tomaras GD, Haynes BF, Morris L, Liao HX.** 2011. Isolation of a monoclonal antibody that targets the alpha-2 helix of gp120 and represents the initial autologous neutralizing-antibody response in an HIV-1 subtype C-infected individual. *J. Virol.* **85**:7719-7729.
72. **Botarelli P, Houlden BA, Haigwood NL, Servis C, Montagna D, Abrignani S.** 1991. N-glycosylation of HIV-gp120 may constrain recognition by T lymphocytes. *J. Immunol.* **147**:3128-3132.



73. **Papandreou MJ, Idziorek T, Miquelis R, Fenouillet E.** 1996. Glycosylation and stability of mature HIV envelope glycoprotein conformation under various conditions. *FEBS Lett.* **379**:171-176.
74. **Julien JP, Cupo A, Sok D, Stanfield RL, Lyumkis D, Deller MC, Klasse PJ, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Ward AB, Wilson IA.** 2013. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**:1477-1483.
75. **Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien JP, Wang SK, Ramos A, Chan-Hui PY, Moyle M, Mitcham JL, Hammond PW, Olsen OA, Phung P, Fling S, Wong CH, Phogat S, Wrin T, Simek MD; Protocol G Principal Investigators, Koff WC, Wilson IA, Burton DR, Poignard P.** 2011. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**:466-470.
76. **Mouquet H, Klein F, Scheid JF, Warncke M, Pietzsch J, Oliveira TY, Velinzon K, Seaman MS, Nussenzweig MC.** 2011. Memory B cell antibodies to HIV-1 gp140 cloned from individuals infected with clade A and B viruses. *PLoS One* **6**:e24078.
77. **Mouquet H, Scharf L, Euler Z, Liu Y, Eden C, Scheid JF, Halper-Stromberg A, Gnanapragasam PN, Spencer DI, Seaman MS, Schuitemaker H, Feizi T, Nussenzweig MC, Bjorkman PJ.** 2012. Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**:E3268-E3277.
78. **Milich L, Margolin B, Swanstrom R.** 1993. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J. Virol.* **67**:5623-5634.
79. **Korber BT, Farber RM, Wolpert DH, Lapedes AS.** 1993. Covariation of mutations in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein: an information theoretic analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**:7176-7180.
80. **Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-659.
81. **Doria A, Iaccarino L, Sarzi-Puttini P, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Cutolo M, Todesco S.** 2006. Estrogens in pregnancy and systemic lupus erythematosus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1069**:247-256.

82. **Levitz M, Young BK.** 1977. Estrogens in pregnancy. *Vitam. Horm.* **35**:109-147.
83. **Johansson ED.** 1969. Plasma levels of progesterone in pregnancy measured by a rapid competitive protein binding technique. *Acta Endocrinol. (Copenh.).* **61**:607-617.
84. **Straub RH.** 2007. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr. Rev.* **28**:521-574.
85. **Hel Z, Stringer E, Mestecky J.** 2010. Sex steroid hormones, hormonal contraception, and the immunobiology of human immunodeficiency virus-1 infection. *Endocr. Rev.* **31**:79-97.
86. **Canellada A, Blois S, Gentile T, Margni Idehu RA.** 2002. In vitro modulation of protective antibody responses by estrogen, progesterone and interleukin-6. *Am. J. Reprod. Immunol.* **48**:334-343.
87. **Zen M, Ghirardello A, Iaccarino L, Tonon M, Campana C, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Doria A.** 2010. Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. *Swiss Med. Wkly* **140**:187-201.
88. **Wilson R, Maclean MA, Jenkins C, Kinnane D, Mooney J, Walker JJ.** 2001. Abnormal immunoglobulin subclass patterns in women with a history of recurrent miscarriage. *Fertil. Steril.* **76**:915-917.
89. **Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, Amino N.** 1997. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **37**:368-377.
90. **Pazos M, Sperling RS, Moran TM, Kraus TA.** 2012. The influence of pregnancy on systemic immunity. *Immunol. Res.* **54**:254-261.
91. **Tranchot-Diallo J, Gras G, Parnet-Mathieu F, Benveniste O, Marcé D, Roques P, Milliez J, Chaouat G, Dormont D.** 1997. Modulations of cytokine expression in pregnant women. *Am. J. Reprod. Immunol.* **37**:215-226.
92. **Bisset LR, Fiddes TM, Gillett WR, Wilson PD, Griffin JF.** 1990. Altered humoral immunoregulation during human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **23**:4-9.
93. **Brambell FW, Halliday R, Brierley J, Hemmings WA.** 1954. Transference of passive immunity from mother to young. *Lancet* **266**:964-965.
94. **Simister NE.** 2003. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* **21**:3365-3369.

95. **Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG.** 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* **5**:266-271.
96. **Cormier EG, Tran DN, Yukhayeva L, Olson WC, Dragic T.** 2001. Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complexes. *J. Virol.* **75**:5541-5549.
97. **Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J.** 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**:1949-1953.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Estimates of nucleotide diversity and substitution rates in the HIV-1 envelope gene in subjects from Group 1 and Group 2.** Nucleotide p-distance, the rate of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (dN), and the rate of synonymous substitutions per synonymous site (dS) were computed for individual subjects from Group 1 (pregnant; closed circles) and Group 2 (non-pregnant; open circles) based on the nucleotide sequences of a 945 base pair DNA fragment spanning the Env C1-C3 region (positions 6430-7374 of HXB2), as described under Materials and Methods. Statistical significance of the differences between groups was tested using the Mann-Whitney *U* test. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

**Figure 2. Overall selective pressure exerted on HIV-1 envelope gene in subjects from Group 1 and Group 2.** A. Overall  $\omega$  (dN/dS) was computed for individual subjects from Group 1 (pregnant; closed circles) and Group 2 (non-pregnant; open circles) based on the nucleotide sequence of a 945 base pair DNA fragment spanning the Env C1-C3 region (positions 6430-7374 of HXB2), as described under Materials and Methods. Statistical significance of the differences between groups was tested using the Mann-Whitney *U* test. B.  $\omega$  was computed for individual subjects from Group 1 (pregnant) and Group 2 (non-pregnant) based on the nucleotide sequences of DNA segments encoding each Env protein subregion (C1, V1, V2, C2, V3, C3), as described under Materials and Methods. The statistical

significance of differences in median  $\omega$  values between all subregions was tested using the Wilcoxon signed rank test. Lower  $p$  values appear as darker squares in the matrix display. C.  $\omega$  was computed for individual subjects from Group 1 (pregnant) and Group 2 (non-pregnant) based on the nucleotide sequences of DNA segments encoding each Env protein subregion (C1, V1, V2, C2, V3, C3), as described under Materials and Methods. The statistical significance of differences in  $\omega$  values was tested in a pairwise manner between pregnant and non-pregnant subjects using the Mann-Whitney  $U$  test. Lines represent median  $\omega$  values, boxes represent the interquartile range (IQR), and whiskers represent the range.  $p$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

**Figure 3. Mapping of high frequency positively selected sites.** A. To eliminate background noise arising from interindividual differences, a binomial test was performed on the data pertaining to all positively selected sites identified in all study participants, as described under Materials and Methods. Resulting  $p$  values were plotted for each amino acid position in HIV-1 envelope protein, with  $p$  values  $< 0.05$  considered statistically significant. B. Three-dimensional structure of gp120 in the HIV-1 envelope spike. The backbone of one gp120 protomer is represented, while the two other gp120 protomers and the gp41 trimer are represented as surfaces. The C1-C3 gp120 segment is highlighted in red, while PS sites that were common to both groups or that were associated to Group 1 (pregnant) and Group2 (non-pregnant) are highlighted in yellow, green and blue, respectively. Left, side view; right, top view.

**Figure 4. Mapping of positively selected sites in subjects from Group 1 and Group 2.** Codons under positive selection (positively selected sites) were identified as described under Materials and Methods. For each positively selected site, the frequency of selection was plotted for subjects from Group 1 (pregnant) and Group 2 (non-pregnant). The different domains, subregions and features of the HIV-1 Env protein are represented as follows: pink, variable regions; light orange, constant regions; light purple, inner domain; dark purple, outer domain; orange, potential N-glycosylation sites (PNGS); light blue, length polymorphic regions of V1 and V2; light green, bridging sheet (80); dark blue, coreceptor binding site (96,97); dark green, CD4 binding site (96,97); gray, CD4<sup>+</sup> T cell epitopes (38); red, A-list

CD8<sup>+</sup> T cell epitopes (38); yellow, human antibody epitopes (38). Statistically significant differences in selected sites between subjects from Group 1 (pregnant; blue) and Group 2 (non-pregnant; red) were identified using hypergeometric testing (bottom panel), as described under Materials and Methods. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

**Figure 5. Evolution of genetic diversity and of overall selective pressure in subjects from Group 3 during the course of pregnancy.**

A. Nucleotide *p*-distance, the rate of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (dN), and the rate of synonymous substitutions per synonymous site (dS) were computed for individual subjects from Group 3 (pregnant; longitudinal treated) at different time points during pregnancy (first, second and third trimesters of gestation) based on the nucleotide sequences of a 945 base pair DNA fragment spanning the Env C1-C3 region (positions 6430-7374 of HXB2), as described under Materials and Methods. B. Overall  $\omega$  (dN/dS) was computed for individual subjects from Group 3 at different time points during pregnancy (first, second and third trimesters of gestation) based on the nucleotide sequence of a 945 base pair DNA fragment spanning the Env C1-C3 region (left panel) and based on the nucleotide sequences of DNA segments encoding each Env protein subregion (C1, V1, V2, C2, V3, C3; right panels), as described under Materials and Methods. Statistical significance of the differences between the first and the third trimesters of gestation was tested using the Wilcoxon signed rank test. Lines represent median values, boxes represent the interquartile range (IQR), and whiskers represent the range. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

**Figure 6. Evolution of positively selected sites in subjects from Group 3 during the course of pregnancy.** Codons under positive selection (positively selected sites) were identified as described under Materials and Methods. For each positively selected site, the frequency of selection was plotted for subjects from Group 3 at different time points during pregnancy (first, second and third trimesters of gestation). Right panel. The different domains, subregions and features of the HIV-1 Env protein are represented as follows: pink, variable regions; light orange, constant regions; light purple, inner domain; dark purple, outer domain; orange, potential N-glycosylation sites (PNGS); light blue, length polymorphic regions of V1

and V2; light green, bridging sheet (80); dark blue, coreceptor binding site (96,97); dark green, CD4 binding site (96,97); gray, CD4<sup>+</sup> T cell epitopes (38); red, A-list CD8<sup>+</sup> T cell epitopes (38); yellow, human antibody epitopes (38). Left panel. Evolution of number of positively selected sites per subject. Number of selected sites were computed for every subject and plotted as a bar graph. Statistical significance of the differences between the first and the subsequent trimesters of gestation was tested using the Wilcoxon signed rank test. Data are presented as median and interquartile range (IQR), and whiskers represent the range. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

**Table 1. Clinical characteristics of study groups.**

|                                 | Pregnancy status | Number of subjects | Trimester of gestation <sup>a</sup> | Number of sequences | Treated with ART | CD4 <sup>+</sup> T cell counts <sup>b</sup> | CD8 <sup>+</sup> T cell counts <sup>b</sup> | HIV-1 viral load <sup>c</sup> |
|---------------------------------|------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------|------------------|---|---|-------------------------------|
| <b>Cross sectional analysis</b> |                  |                    |                                     |                     |                  |   |   |                               |
| Group 1                         | Pregnant         | 31                 | NA                                  | 542                 | 0/31             | 263.5 (93.00-398.0)                         | NA  | 4.530 (4.203-5.140)           |
| Group 2                         | Non-pregnant     | 29                 | NA                                  | 693                 | 0/29             | 337.0 (262.0-438.0)                         | NA  | 4.720 (4.130-4.960)           |
|                                 |                  |                    |                                     |                     |                  | 0.0495                                      | NA  | 0.7387                        |
| <b>Longitudinal analysis</b>    |                  |                    |                                     |                     |                  |   |   |                               |
| Group 3                         | Pregnant         | 16                 | 1 <sup>st</sup>                     | 361                 | 3/16             | 200 (120.0-300.0)                           | 720.0 (470.0-855.0)                         | 4.270 (3.960-4.580)           |
|                                 |                  |                    | 2 <sup>nd</sup>                     | 337                 | 16/16            | 220.5 (132.0-447.0)                         | 687.5 (477.5-1142)                          | 2.295 (1.955-3.615)           |
|                                 |                  |                    | 3 <sup>rd</sup>                     | 319                 | 16/16            | 255.0 (156.0-338.8)                         | 720.0 (550.0-1190)                          | 2.700 (1.700-3.875)           |
|                                 |                  |                    |                                     |                     |                  | 0.0207                                      | 0.0428                                      | 0.0005                        |

<sup>a</sup>1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> trimesters are defined as 0-13 weeks, 14-27 weeks, and 28+ weeks of gestation.

<sup>b</sup>CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts are expressed as number of cells per mm<sup>3</sup>. Values are presented as median and interquartile range (IQR).

<sup>c</sup>HIV-1 viral load is expressed as log<sub>10</sub> RNA copies per mm<sup>3</sup>. Values are presented as median and interquartile range (IQR).

<sup>d</sup>*p*-values refer to comparisons between data from Groups 1 and 2 using the Mann-Whitney *U* test.

<sup>c</sup>*p*-values refer to comparisons between data from the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of gestation using the Mann-Whitney *U* test.

NA: data not available.



**Supplemental Table 1. Clinical data and accession numbers.**

| <b>Subjects<sup>a</sup></b> | <b>HIV-1 subtype</b> | <b>Country of origin</b> | <b>CD4 cell counts<sup>b</sup></b> | <b>Viral load<sup>c</sup></b> | <b>Number of sequences</b> | <b>GenBank accession numbers</b> | <b>Reference</b> |
|-----------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------|
| <b>Pregnant</b>             |                      |                          |                                    |                               |                            |                                  |                  |
| TV479a                      | B                    | Canada                   | 192                                | 2.71                          | 71                         | KF038436-KF038566;               | [1]              |
| TV479b                      |                      |                          | 304                                | 3.71                          | 60                         | KF038595-KF039148;               |                  |
| TV643                       | B                    | Haiti                    | 350                                | 4.27                          | 63                         | KF039166-KF039521;               |                  |
| TV669                       | B                    | Canada                   | 555                                | 2.81                          | 69                         | KF039537-KF039675                |                  |
| TV715a                      | C                    | Congo                    | 51                                 | 2.88                          | 77                         |                                  |                  |
| TV715b                      |                      |                          | 200                                | 4.23                          | 60                         |                                  |                  |
| TV805                       | B                    | Haiti                    | 270                                | 3.05                          | 40                         |                                  |                  |
| TV823                       | B                    | Canada                   | 234                                | 1.87                          | 38                         |                                  |                  |
| TV895                       | B                    | Canada                   | 528                                | 1.87                          | 20                         |                                  |                  |
| TV995                       | D                    | Congo                    | 496                                | 2.46                          | 52                         |                                  |                  |
| TV1005                      | B                    | Canada                   | 198                                | 2.52                          | 71                         |                                  |                  |
| TV1011                      | B                    | Haiti                    | 90                                 | 4.20                          | 64                         |                                  |                  |
| TV1021b                     | C                    | Congo                    | 242                                | 2.03                          | 56                         |                                  |                  |
| TV1151                      | A1                   | Rwanda                   | 156                                | 3.20                          | 58                         |                                  |                  |
| TV1161                      | C                    | Zambia                   | 400                                | 1.88                          | 67                         |                                  |                  |

|         |        |          |      |      |    |                     |     |
|---------|--------|----------|------|------|----|---------------------|-----|
| TV1203  | CRF-13 | Congo    | 90   | 3.96 | 62 |                     |     |
| TV1217  | B      | Haiti    | 190  | 4.81 | 55 |                     |     |
| TV1261  | C      | Zimbabwe | 120  | 3.84 | 58 |                     |     |
| TV1267a | C      | Congo    | 500  | 3.90 | 71 |                     |     |
| TV1267b |        |          | 513  | 4.90 | 68 |                     |     |
| 1468mo  | C      | Malawi   | 274  | 4.56 | 17 | JF722677 - JF722693 | [2] |
| 1472mo  | C      | Malawi   | 397  | 4.71 | 15 | JF722719 - JF722733 |     |
| 1646mo  | C      | Malawi   | 95.0 | 5.96 | 14 | JF722835 - JF722848 |     |
| 1702mo  | C      | Malawi   | 273  | NA   | 12 | JF722874 - JF722885 |     |
| 2080mo  | C      | Malawi   | 91.0 | 5.22 | 14 | JF722905 - JF722918 |     |
| 2400mo  | C      | Malawi   | 439  | 4.99 | 16 | JF722952 - JF722967 |     |
| 2502mo  | C      | Malawi   | 38.0 | 5.19 | 12 | JF723036 - JF723047 |     |
| 2544mo  | C      | Malawi   | NA   | 5.77 | 18 | JF723080 - JF723098 |     |
| 2797mo  | C      | Malawi   | 399  | NA   | 14 | JF723123 - JF723136 |     |
| 3274mo  | C      | Malawi   | 103  | NA   | 13 | JF723152 - JF723164 |     |
| DM1     | D      | Uganda   | NA   | NA   | 16 | EF575354 - EF575486 | [3] |
| DM2     | D      | Uganda   | NA   | NA   | 14 |                     |     |
| DM3     | D      | Uganda   | NA   | NA   | 16 |                     |     |
| DM4     | D      | Uganda   | NA   | NA   | 14 |                     |     |
| DM5     | D      | Uganda   | NA   | NA   | 15 |                     |     |
| DM6     | D      | Uganda   | NA   | NA   | 15 |                     |     |

|     |   |        |    |    |    |
|-----|---|--------|----|----|----|
| DM7 | D | Uganda | NA | NA | 11 |
| DM8 | D | Uganda | NA | NA | 16 |
| DM9 | D | Uganda | NA | NA | 16 |

---

**Non-pregnant**

|         |   |                     |     |      |    |   |
|---------|---|---------------------|-----|------|----|---|
| 107NAB  | B | Switzerland         | NA  | NA   | 10 | EF643659 - EF643661; [4]<br>EF643680 - EF643684;<br>EF643687-EF643688 |
| 135     | B | USA                 | 384 | 1.70 | 52 | DQ410427 - DQ410478 [5]   |
| 148     | B | USA                 | 638 | 1.70 | 32 | DQ410479 - DQ410510   |
| C98     | B | USA                 | 426 | 4.25 | 19 | DQ410588 DQ410606   |
| C109    | B | USA                 | 222 | 4.79 | 12 | DQ410607 -DQ410618  |
| SC46    | B | Trinidad and Tobago | NA  | 3.62 | 22 | HQ217651 - HQ217672 [6]   |
| SMRE    | B | USA                 | 209 | 5.13 | 25 | EF593254; EU578469 -<br>EU578492                                      |
| TT31    | B | Trinidad and Tobago | 525 | 4.30 | 14 | EU578612 - EU578625   |
| TT106   | B | Trinidad and Tobago | NA  | 3.81 | 24 | HQ217760 - HQ217783   |
| UNC4484 | B | USA                 | 244 | 3.88 | 19 | EU577828 - EU577846   |
| UNC4911 | B | USA                 | 438 | 4.13 | 19 | EU577847 - EU577865   |
| UNC5057 | B | USA                 | 277 | 5.15 | 14 | EU577866 - EU577879   |
| UNC5283 | B | USA                 | 455 | 4.63 | 23 | EU577880 - EU577902   |

|            |   |        |     |      |    |                         |
|------------|---|--------|-----|------|----|-------------------------|
| UNC5479    | B | USA    | 382 | 4.19 | 21 | EU577914 - EU577934     |
| UNC5548    | B | USA    | 337 | 3.19 | 21 | EU577950 - EU577970     |
| UNC5734    | B | USA    | 317 | 4.11 | 12 | EU577971 - EU577982     |
| UNC5791    | B | USA    | 262 | 4.82 | 9  | EU577999 - EU578007     |
| UNC7092    | B | USA    | 333 | 4.81 | 11 | EU578047 - EU578057     |
| WAR        | B | USA    | NA  | 4.22 | 34 | HQ217784 - HQ217817     |
| ZAMBIA178F | C | Zambia | NA  | 4.19 | 26 | EU166353 - EU166378 [7] |
| ZAMBIA184F | C | Zambia | NA  | 4.95 | 26 | EU166413 - EU166438     |
| ZAMBIA206F | C | Zambia | NA  | 4.94 | 35 | EU166439 - EU166473     |
| ZAMBIA215F | C | Zambia | NA  | 5.78 | 32 | EU166544 - EU166575     |
| ZAMBIA231F | C | Zambia | NA  | 4.94 | 48 | EU166605 - EU166652     |
| ZAMBIA235F | C | Zambia | NA  | 5.36 | 28 | EU166653 - EU166680     |
| ZAMBIA185F | C | Zambia | NA  | 4.96 | 44 | GQ485327 - GQ485414 [8] |
| ZAMBIA375  | C | Zambia | NA  | 4.72 | 10 | GU329053 - GU329062 [9] |
| ZAMBIA376  | C | Zambia | NA  | 5.02 | 15 | GU329063 - GU329077     |
| ZAMBIA414  | C | Zambia | NA  | 5.33 | 21 | GU329415 - GU329436     |

<sup>a</sup>First and second pregnancies of the same subject are represented by letters a and b, respectively.

<sup>b</sup>CD4<sup>+</sup> T cell counts are expressed in number of cells per mm<sup>3</sup>. Data from reference [1] are median values from the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy.

<sup>c</sup>Viral load is expressed as log<sub>10</sub> RNA copies per mm<sup>3</sup>. Data from reference [1] are median values from the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy.

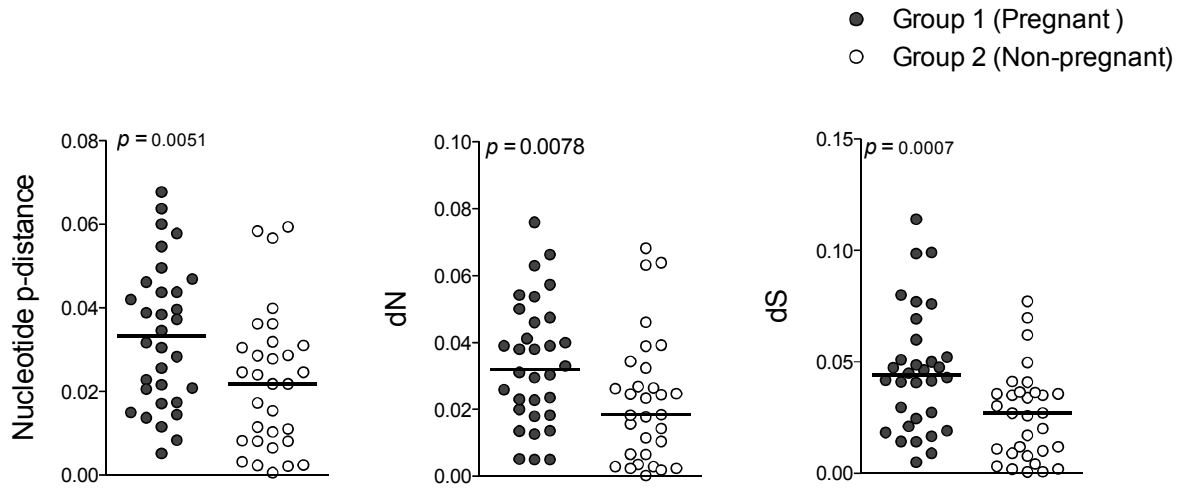
NA: data not available.

## References

1. **Ransy DG, Motorina A, Merindol N, Akouamba BS, Samson J, Lie Y, Napolitano LA, Lapointe N, Boucher M, Soudeyns H.** 2014. Evolution of HIV-1 coreceptor usage and coreceptor switching during pregnancy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **30**:312-324.
2. **Kumar SB, Handelman SK, Voronkin I, Mwapasa V, Janies D, Rogerson SJ, Meshnick SR, Kwiek JJ.** 2011. Different regions of HIV-1 subtype C env are associated with placental localization and in utero mother-to-child transmission. *J. Virol.* **85**:7142-7152.
3. **Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, Whitcomb JM, Young AM, Donnell D, Mmiro F, Musoke P, Guay LA, Jackson JB, Parkin NT, Petropoulos CJ.** 2007. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *J. Virol.* **81**:7885-7893.
4. **Manrique A, Rusert P, Joos B, Fischer M, Kuster H, Leemann C, Niederöst B, Weber R, Stiegler G, Katinger H, Günthard HF, Trkola A.** 2007. In vivo and in vitro escape from neutralizing antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. *J. Virol.* **81**:8793-8808.
5. **Bailey JR, Lassen KG, Yang HC, Quinn TC, Ray SC, Blankson JN, Siliciano RF.** 2006. Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* **80**:4758-4770.
6. **Gnanakaran S, Bhattacharya T, Daniels M, Keele BF, Hraber PT, Lapedes AS, Shen T, Gaschen B, Krishnamoorthy M, Li H, Decker JM, Salazar-Gonzalez JF, Wang S, Jiang C, Gao F, Swanstrom R, Anderson JA, Ping LH, Cohen**

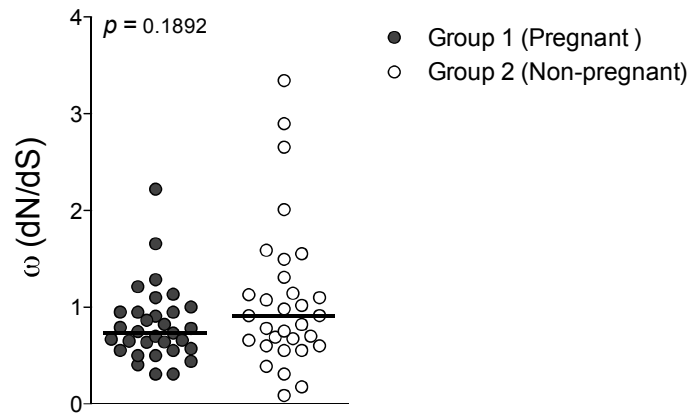
- MS, Markowitz M, Goepfert PA, Saag MS, Eron JJ, Hicks CB, Blattner WA, Tomaras GD, Asmal M, Letvin NL, Gilbert PB, Decamp AC, Magaret CA, Schief WR, Ban YE, Zhang M, Soderberg KA, Sodroski JG, Haynes BF, Shaw GM, Hahn BH, Korber B.** 2011. Recurrent signature patterns in HIV-1 B clade envelope glycoproteins associated with either early or chronic infections. *PLoS Pathog.* **7**:e1002209.
7. **Salazar-Gonzalez JF, Bailes E, Pham KT, Salazar MG, Guffey MB, Keele BF, Derdeyn CA, Farmer P, Hunter E, Allen S, Manigart O, Mulenga J, Anderson JA, Swanstrom R, Haynes BF, Athreya GS, Korber BT, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH.** 2008. Deciphering human immunodeficiency virus type 1 transmission and early envelope diversification by single-genome amplification and sequencing. *J. Virol.* **82**:3952-3970.
8. **Rong R, Li B, Lynch RM, Haaland RE, Murphy MK, Mulenga J, Allen SA, Pinter A, Shaw GM, Hunter E, Robinson JE, Gnanakaran S, Derdeyn CA.** 2009. Escape from autologous neutralizing antibodies in acute/early subtype C HIV-1 infection requires multiple pathways. *PLoS Pathog.* **5**:e1000594.
9. **Kirchherr JL, Hamilton J, Lu X, Gnanakaran S, Muldoon M, Daniels M, Kasongo W, Chalwe V, Mulenga C, Mwananyanda L, Musonda RM, Yuan X, Montefiori DC, Korber BT, Haynes BF, Gao F.** 2011. Identification of amino acid substitutions associated with neutralization phenotype in the human immunodeficiency virus type-1 subtype C gp120. *Virology* **409**:163-174

Figure 1.

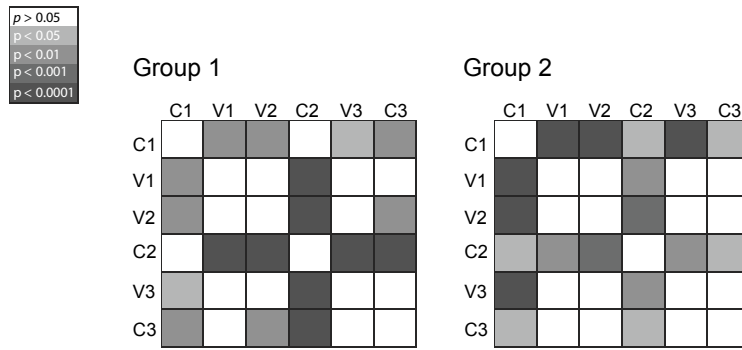


**Figure 2.**

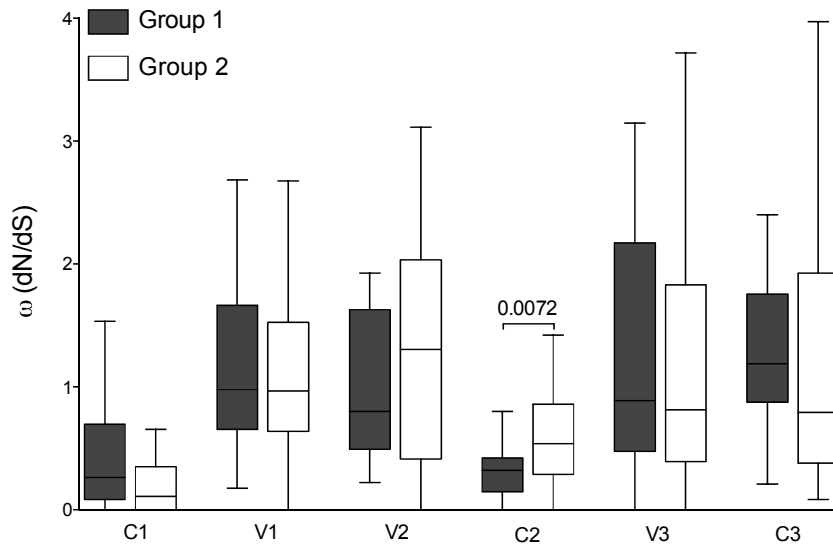
**A**



**B**



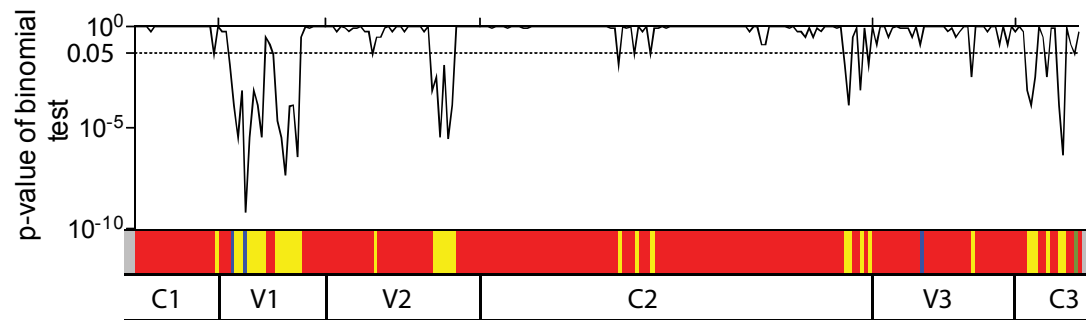
**C**





**Figure 3.**

A



B

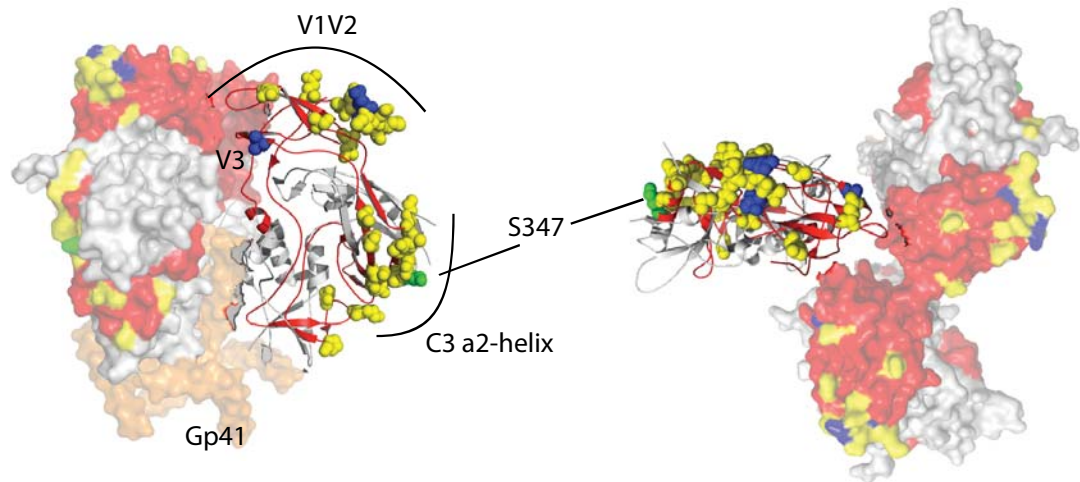
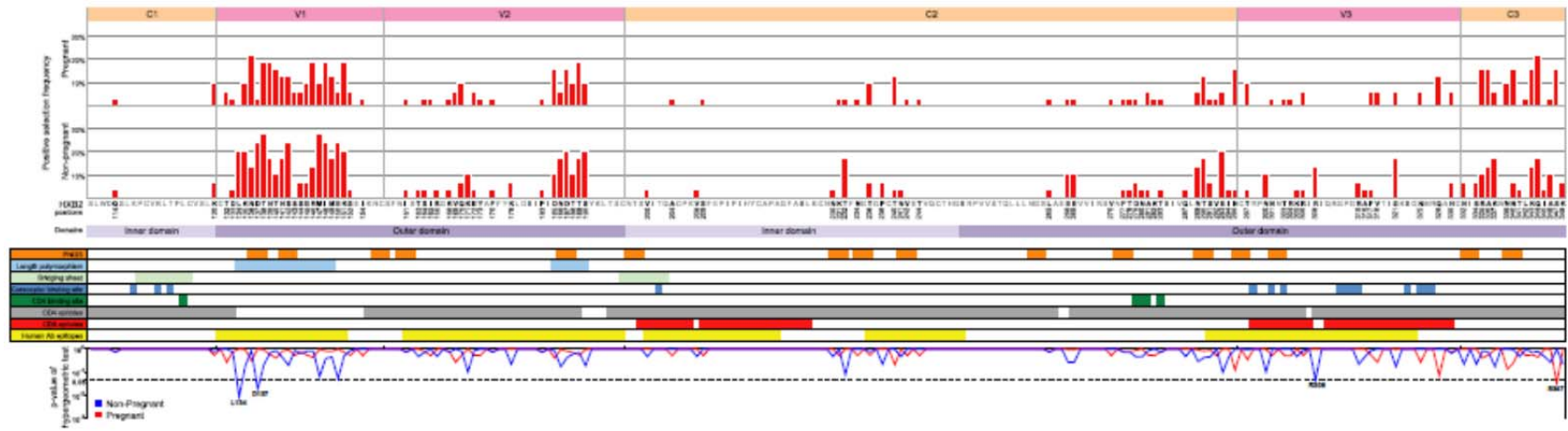
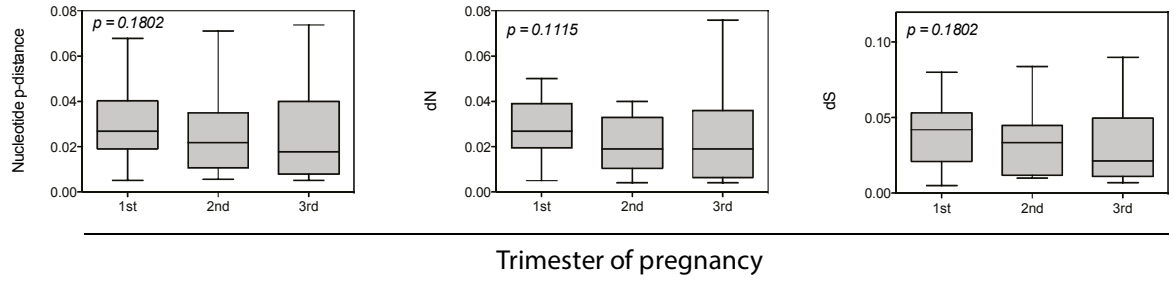


Figure 4.

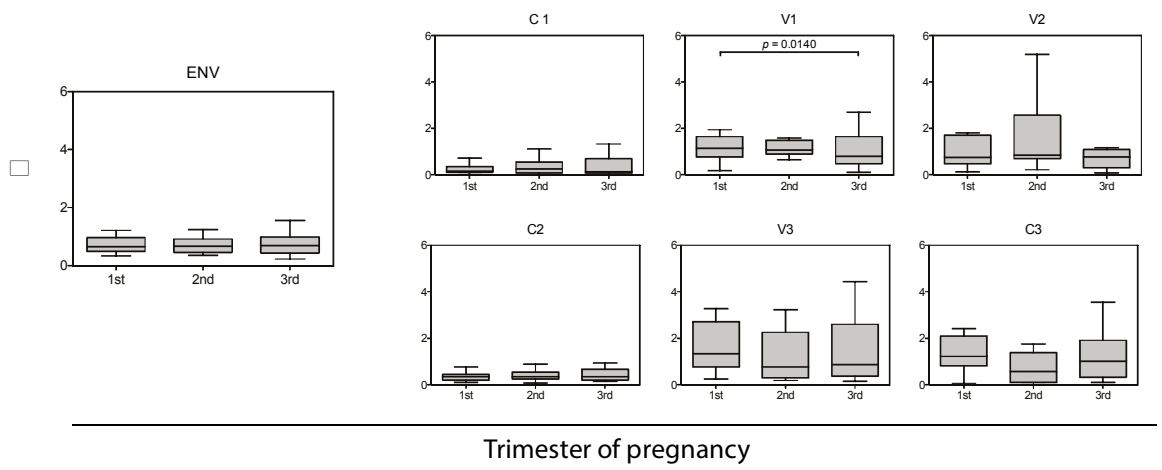


**Figure 5.**

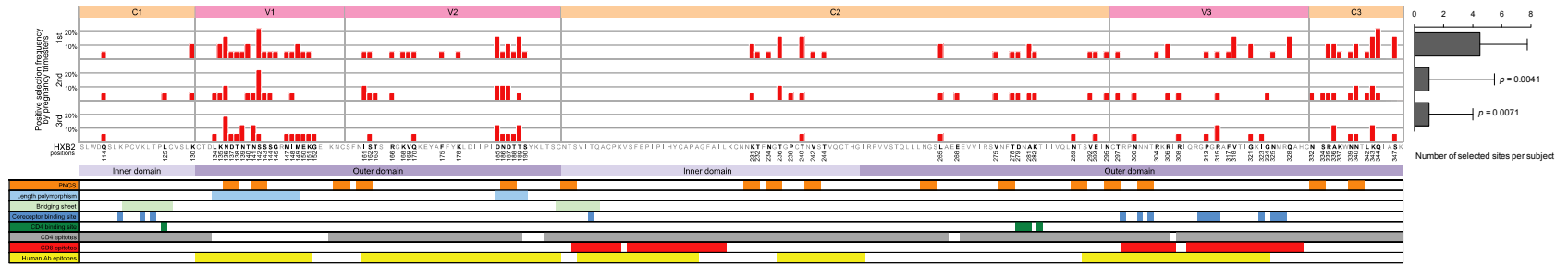
**A**



**B**



**Figure 6.**



## TRANSITION 2

Au cours du 1<sup>er</sup> chapitre, nous avons observé que l'allongement de la boucle V1V2 et l'addition de PNGS dans cette même région accompagnaient l'évolution du tropisme chez une patiente infectée par un virus de sous-type C (TV175) (Ransy *et al.* 2014). Le switch s'accompagnait chez cette patiente de l'allongement de V1V2, de l'addition de PNGS dans V1V2 et de l'augmentation du score PSSM (Figure 20).

De plus, en observant la distribution du score PSSM dans notre cohorte de sujets infectées par le virus de tropisme R5, nous avons pu remarquer que les populations virales des patientes les plus récentes arboraient des scores PSSM plus élevés que celles des patientes plus anciennes (Figure 21, panel de gauche). En effet, le score PSSM était positivement corrélé à l'année d'échantillonnage des virus des patientes (Figure 21, panel de droite).

De même, un allongement de V1V2 avec une addition de PNGS dans cette région à l'échelle de la population a été rapporté (Bunnik *et al.* 2010a). Indépendamment, des études ont montré une augmentation de la l'occurrence de switch chez certains sous-types au cours de l'épidémie (Connell *et al.* 2008; Esbjornsson *et al.* 2010; Gupta *et al.* 2013).

Nous émettons l'hypothèse que le tropisme viral évolue au cours de l'épidémie et que cette évolution est corrélée à L 'allongement de V1V2. Dans le chapitre suivant, nous étudierons donc l'évolution des déterminants du tropisme au cours de l'épidémie.

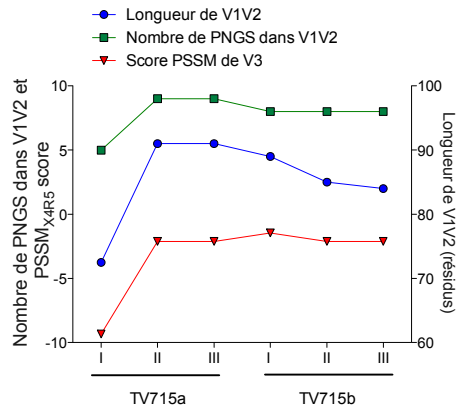


Figure 20. Évolution du score PSSM, de la longueur de V1V2 et du nombre de PNGS dans V1V2 au cours des 2 grossesses de la patiente TV715.

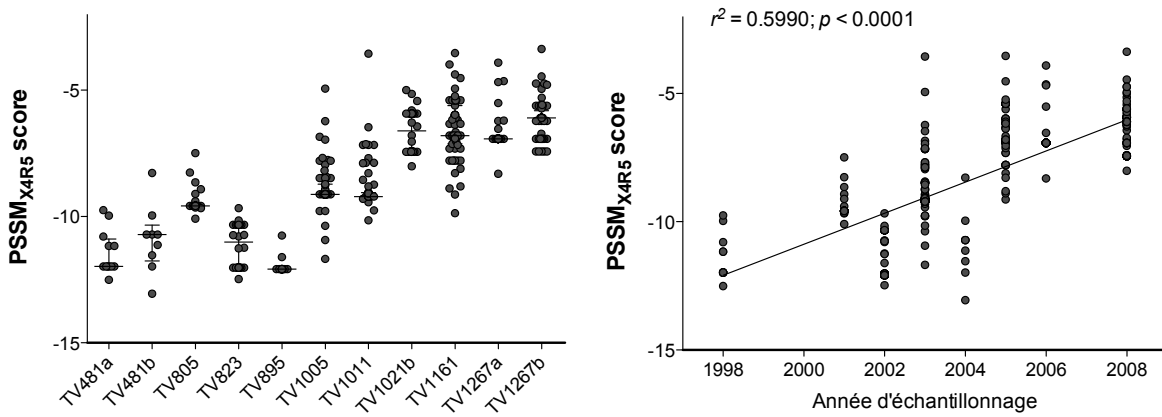


Figure 21. Score PSSM des séquences de nos patientes R5, classé par patiente (panel de gauche) ou en fonction de l'année d'échantillonnage (panel de droite).

## **CHAPITRE III : EVOLUTION DU TROPISME DU VIH- I À L'ÉCHELLE DE LA POPULATION**

## **Résumé**

La grande capacité d'adaptation du VIH-1 a entraîné l'évolution adaptative des gènes viraux à l'échelle de la population. En effet, l'élongation et l'addition de sites de N-glycosylation dans les régions variables du gène de l'enveloppe ont été observées à l'échelle de la population au cours de l'épidémie. Étant donné que la longueur et les sites potentiels de N-glycosylation dans les régions variables sont associées au tropisme viral, nous émettons l'hypothèse qu'une évolution adaptative du tropisme des corécepteurs du VIH-1 a eut lieu au cours de l'épidémie et à l'échelle de la population.

Nous avons analysé et comparé les déterminants du tropisme entre des groupes de séquences anciennes et contemporaines de virus R5 de sous-types B, C et D provenant des bases de données du Laboratoire national de Los Alamos.

Les séquences R5 contemporaines montraient des caractéristiques moléculaires dans V1, V2 et V3 similaires aux virus X4 contrairement aux séquences R5 anciennes.

Les résultats présentés ici, supportent l'hypothèse d'une évolution adaptative du tropisme du VIH-1 à l'échelle de la population. Ces résultats permettent de comprendre le mécanisme à l'origine de l'augmentation de l'incidence de souches X4 du VIH-1 au cours de l'épidémie.



# ADAPTIVE EVOLUTION OF HIV-1 CORECEPTOR TROPISM AT THE POPULATION LEVEL

Doris G. Ransy,<sup>1,2</sup> Hugo Soudeyns,<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada. <sup>2</sup>Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. <sup>3</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

## ABSTRACT

**Background:** The great adaptive ability of HIV-1 has led to adaptive evolution of the viral genes at the population level. Indeed, elongation and addition of N-linked glycosylation sites in variable regions of the envelope gene have been observed at the population level during the course of the HIV-1 epidemic. As length and potential N-glycosylation sites (PNGS) in variable regions have been associated with viral tropism, we hypothesize that adaptive evolution of coreceptor tropism can occur at the population level.

**Methods:** We analysed and compared coreceptor tropism determinants between ancient and contemporary sequences of CCR5-using (R5) HIV-1 of subtypes B, C and D that were retrieved from the HIV databases.

**Results:** Contemporary R5 sequences acquired X4-like molecular characteristics in V1, V2 and V3 as compared to ancient R5 sequences.

**Conclusion:** The results presented herein substantiate the hypothesis of an adaptive evolution of HIV-1 coreceptor tropism at the population level. They give an insight in the underlying mechanism of the increasing incidence of X4 viruses over the course of the epidemic.

## INTRODUCTION

HIV-1 evolves during the course of the infection due to high viral turnover, the error prone viral reverse transcriptase, and to the immune pressure applied by the host immune system [1,2]. Immune escape leads to adaptive evolution of the virus especially in the viral envelope

gene (*env*) that is subjected to both humoral and cell mediated immune responses [3]. Viral escape translates in part into dramatic elongation of the Env variable loops and addition of potential N-linked glycosylation sites (PNGS) to these regions especially in the V1V2 loop [4]. Adaptive evolution of *env* can also lead to switch of coreceptor tropism from CCR5-using viruses (R5) to CXCR4-using viruses (X4), which can occur at varying incidences depending on the infecting HIV-1 subtype [5-7]. Although the underlying mechanisms for the switch are not fully understood, some studies have suggested that cell mediated [8] or humoral mediated [9] immune pressure could be involve in this process. In infected individuals, X4 viruses emerge from an infecting R5 strain through accumulation of mutations primarily in V3 [10,11] and in other regions such as V1V2 [12,13], or V4 [14]. Elongation of V1V2 and addition of PNGS have been associated to the emergence of X4 viruses in some HIV-1 subtypes [15].

Adaptive evolution not only occurs in infected individuals but can also arise at the population level. Indeed, adaptation of gp120 to humoral immunity through elongation and addition of PNGS in variable loops occurs at a population level leading to an enhanced resistance to antibody neutralization in contemporary viruses as compared to ancient/early viruses [16,17]. Reports of an increasing incidence of X4 viruses in late stages disease in some HIV-1 subtypes over the years points to the likelihood that adaptive evolution of HIV-1 coreceptor tropism could occur at the population level [18-20].

Here we hypothesize that adaptive evolution HIV-1 coreceptor usage can also take place at the population level and that the elongation of the gp120 variable loops is associated with this evolution of tropism. We investigated and compared coreceptor tropism determinants in ancient and contemporary R5 viruses. We found that coreceptor tropism determinants have evolved towards an accumulation of X4-like mutations in contemporary R5 viruses as compared to ancient R5 strains.

## **METHODS**

### **Datasets**

All sequence sets were retrieved from the HIV databases at the Los Alamos National laboratory [21] and exclusively comprise sequences of HIV-1 viruses that tropism have been

determined experimentally. Sequences spanning regions V1-V3 of *env* were used in the great majority of the analysis, and a second set of sequences including only V2 sequences was used in the V2 likelihood index validation (see below).

The subtype B datasets included 266 V1-V3 sequences of X4 tropism, spanning years 1983-2010, and 119 *env* sequences of R5 viruses, spanning years 1985-2006, all from the Bunnik *et al.* (2010) study [16]. All sequences from the Bunnik study were sampled within 4.5 month following seroconversion. The subtype C datasets comprised 61 V1-V3 sequences of X4 tropism spanning years 1988-2005 and 295 V1-V3 sequences of R5 tropism spanning years 1989-2009. Finally, subtype D datasets included 159 V1-V3 sequences of X4 tropism spanning years 1983-2002 and 172 V1-V3 sequences of R5 tropism spanning years 1993-2001.

The datasets used for the validation of the V2 likelihood index included: i) Subtype B: 1637 R5 V2 sequences and 387 X4 V2 sequences, ii) Subtype C: 982 R5 V2 sequences and 60 X4 V2 sequences and iii) Subtype D: 220 R5 V2 sequences and 133 X4 V2 sequences.

### **Sequence analysis**

All individual datasets were codon aligned using the Hmmer [22] implemented in gene cutter tool on HIV databases and subsequently manually edited in MEGA 5. V3 sequences were submitted to PSSM<sub>X4R5</sub> [23] for subtypes B and D isolates and PSSM<sub>SINSI</sub> [24] for subtype C isolates. Number of PNGS in V1 and V2 were calculated using N-glycosite tool available on the HIV-databases [25].

In order to provide an indicator of the proportion of X4 related mutations in a V2 sequence, a position-specific scoring matrix was assembled based on data published by Hoffman *et al.* [12] and Thielen *et al.* [26] These 2 studies have identified substitutions in V2 that occurred at different frequencies in X4 and R5 sequences. Based on these frequencies, a likelihood index for V2 was computed which is an indicator of the relative abundance of X4-associated substitutions within a given V2 sequence. Briefly, log likelihood ratios ( $\ln [f_{X4}/f_{R5}]$ ) were calculated for each of the 13 most relevant amino acid positions in V2 (i.e. 161, 164-166, 169, 173, 177, 182, 184, 190-192, and 195). The likelihood index of a given V2 sequence was defined as the sum of log likelihood ratios derived from this sequence. The higher the index, the closer the V2 sequence was to an actual X4 sequence [15].

In order to assess the evolution of coreceptor tropism at the population level, R5 V1-V3 sequences were split into ancient (before the year 2000) versus contemporary sequences (after the year 2000) and then compared.

### **Statistical analysis**

Data were expressed as median and interquartile range (IQR). The Mann-Whitney *U* test comparison test was used. Relationships between variables were tested using Spearman's rank correlation test. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## **RESULTS**

### **Length and number of PNGS of V1V2 in R5 versus X4 viruses**

As molecular characteristics in the V1V2 region have been associated with coreceptor switch and coreceptor tropism, we first investigated this region in R5 and X4 isolates. First, the length of V1V2 was analysed in R5 versus X4 viruses. In subtype B isolates, X4 sequences harboured longer V1V2 loops (median = 75.0 [72.0-79.0] amino-acids) as compared to R5 viruses (median = 73.0 [70.0-77.0] amino-acids) ( $p = 0.0004$ ; Mann Whitney *U* test) (Figure 1A). This longer V1V2 was due to longer V1 ( $p = 0.0107$ ; Mann Whitney *U* test) and V2 loops ( $p = 0.0054$ ; Mann Whitney *U* test) in X4 sequences than R5 viruses (data not shown). In subtype C sequences, longer V1V2 loops (median = 76.0 [68.0-78.0] amino-acids) were associated to X4 sequences as compared to R5 sequences (median = 73.0 [67.0-77.0] amino-acids) ( $p = 0.0037$ ; Mann Whitney *U* test) (Figure 1A). Here, the longer V1V2 was due to a longer V2 loop ( $p = 0.0008$ ; Mann Whitney *U* test) while V1 length did not differ between R5 and X4 viruses ( $p = 0.4520$ ; Mann Whitney *U* test). The same results were found in subtype D sequences, longer V1V2 loops (median = 58.0 [55.0-66.0] amino-acids) were associated to X4 sequences as compared to R5 sequences (median = 57.0 [54.0-64.0] amino-acids) ( $p = 0.0202$ ; Mann Whitney *U* test) (Figure 1A). As for subtype C, the longer V1V2 was due to a longer V2 loop ( $p < 0.0001$ ; Mann Whitney *U* test) while V1 length did not differ between R5 and X4 viruses ( $p = 0.1969$ ; Mann Whitney *U* test).

When numbers of PNGS were analysed in V1V2, subtype B X4 isolates harboured significantly lower numbers of PNGS than R5 viruses with median values 6.00 (IQR = 5.00-7.00) and 7.00 (IQR = 6.00-8.00) PNGS respectively ( $p < 0.0001$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 1B). Lower numbers of PNGS were also found in subtype C X4 sequences although this difference did not reach statistical significance ( $p = 0.0805$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 1B). In subtype D sequences on the other hand, X4 sequences harboured significantly higher numbers of PNGS than R5 sequences ( $p < 0.0001$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 1B).

### **V2 likelihood index in R5 versus X4 viruses**

The V2 sequence, like V3 bears determinants of tropism in its primary structure, 13 positions in V2 have been associated to differential frequencies in X4 and R5 viruses. We used these frequencies to calculate the V2 likelihood index [15]. We calculated the V2 likelihood index in the V2 sequences that represents the relative abundance of X4-related mutations in a given V2 sequence. The higher the index, the more abundant are the X4-related mutations in a V2 sequence. Briefly, log likelihood ratios [ $\ln(f_{X4}/f_{R5})$ ] were calculated for each of the 13 most relevant amino acid positions in V2 (i.e., 161, 164–166, 169, 173, 177, 182, 184, 190–192, and 195). Substitution frequencies are listed in Figure 2A. In subtype B isolates, X4 sequences exhibited higher values of V2 likelihood indexes as compared to R5 sequences with respective median values of -0.5972 (IQR = [-0.6064] – [+0.5945]) and -0.6064 (IQR = [-0.8324] – [-0.0273]) ( $p < 0.0001$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 2B). The same results were found in subtypes C and D with V2 likelihood indexes being higher in X4 than in R5 sequences ( $p < 0.0001$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 2B).

### **PSSM scores and net charge of V3 in ancient versus contemporary R5 sequences**

V3 is the primary determinant of coreceptor tropism. PSSM score calculated on the V3 sequence gives a score of the relative abundance of X4-like mutations in a given sequence. The higher the PSSM score, the more abundant are the X4-related mutations in a V3 sequence [23]. First of all, we analysed the evolution of the PSSM scores in V3 in R5 sequences at the population level throughout the years. In the subtype B dataset, sequences from Bunnik *et al.* ancient sequences comprised sequences sampled between 1985 and 1989, while contemporary sequences comprised sequences sampled between 2003 and 2006. All sequences from the

subtype B were isolated during primary infection. When PSSM scores were compared between these two groups of sequences, we found that contemporary R5 sequences exhibited higher PSSM<sub>X4R5</sub> scores than ancient R5 sequences with respective median values of -11.81 (IQR = [-12.67] – [-9.577]) and -12.24 (IQR = [-13.09] – [-11.52]) ( $p = 0.004$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 3A). In subtype C, ancient V3 sequences from R5 viruses comprised sequences from sampling years 1988 to 1999, and contemporary sequences comprised sequences from sampling years 2000 to 2009. Similarly to subtype B sequences, we found that greater PSSM<sub>SINSI</sub> scores were associated with contemporary viruses as compare to ancient samples with respective median values of -26.07 (IQR = [-28.67] – [-24.02]) and -27.65 (IQR = [-28.53] – [-25.73]) ( $p = 0.0014$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 3A). Subtype D datasets of sequences were also analyzed and the same results were found as to greater PSSM scores in contemporary R5 sequences (1993-1997) as compared to earlier R5 sequences (1998-2001) with median values of -2.750 (IQR = [-4.130] – [-1.838]) and -5.920 (IQR = [-7.360] – [-2.650]) ( $p < 0.0001$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 3A).

The net charge of V3 is also a determinant of coreceptor tropism, higher V3 charge are associated with X4 tropism. Herein, we compared V3 charge in contemporary and ancient R5 sequences. In subtypes C and D, contemporary R5 sequences showed higher values of V3 net charge than ancient R5 sequences ( $p = 0.0002$  and  $p = 0.0027$ ; Mann Whitney  $U$  test; respectively) whereas no difference was found in subtype B between R% and X4 sequences ( $p = 0.0761$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 3B).

### **V1V2 length and PNGS in ancient versus contemporary R5 sequences and correlation with PSSM scores**

Bunnik *et al.* have reported an elongation of V1 and addition of PNGSs in V1 resulting in the elongation of V1V2 in contemporary viruses as compared to ancient isolates. We find the same results in sequences from subtype B (from the Bunnik study) and for sequences from subtype C (Figure 4A and 4B). In subtype D, contemporary R5 sequences showed longer V1 sequences that were compensated by shorter V2 sequences, thus resulting in no difference in the total V1V2 length between contemporary and ancient sequences (Figure 4A). On the other hand, regarding numbers of PNGS, contemporary V1V2 sequences showed more PNGS than

ancient V1V2 sequences, and this difference was due to higher number of PNGS in the V2 region (Figure 4B).

Furthermore, we assessed the association between PSSM scores and length or number of PNGS in V1V2 in these two subtypes. We found that in R5 viruses of subtype B, V1 length positively correlated with PSSM scores ( $r = 0.329$ ;  $p < 0.0001$ ; Spearman's rank correlation test) (table 1). In subtype C isolates, the length of V1 and V1V2 were both positively correlated to PSSM scores ( $r > 0.168$ ;  $p < 0.002$ ; Spearman's rank correlation test) (table 1). In subtype D sequences we found the same results as for subtype C; the length of V1 and V1V2 were both positively correlated to PSSM scores ( $r > 0.130$ ;  $p < 0.045$ ; Spearman's rank correlation test) (table 1). On the other hand, no correlation was found between the number of PNGS and PSSM scores in all three subtypes ( $r < 0.027$ ;  $p > 0.363$ ; Spearman's rank correlation test) (table 1).

### **V2 likelihood indexes in ancient versus contemporary R5 sequences**

Finally, we looked at the X4 related mutations that occurred in V2 during the epidemic as means of V2 likelihood index. We compared the V2 likelihood indexes in ancient versus contemporary R5 sequences. In subtype B sequences, we found a tendency to a greater V2 index in contemporary sequences (median = -0.5244; IQR = [-1.0340] – [+0.9769]) as compared to early sequences (median = -0.6064; IQR = [-0.6064] – [-0.6064]) ( $p = 0.0741$ ; Mann Whitney  $U$  test) (Figure 5). In subtype C as well as subtype D we find a significant increase in the V2 likelihood indexes between historical and contemporary sequences ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0016$ ; Mann Whitney  $U$  test; respectively) (Figure 5). V2 likelihood indexes correlated with PSSM scores in subtype B ( $r = 0.196$ ;  $p = 0.016$ ; Spearman's rank correlation test) while correlation did not reach statistical significance in subtypes C ( $r = 0.095$ ;  $p = 0.052$ ; Spearman's rank correlation test) or D ( $r = -0.01$ ;  $p = 0.449$ ; Spearman's rank correlation test) (data not shown).

## **DISCUSSION**

During the natural history of HIV-1 infection, viral genes evolve principally under the pressure from the host immune system. The variable regions V1, V2 and V3 of the envelope

gene evolve during the course of the infection and all three regions have been associated with coreceptor tropism determination [12,13,23,26-32].

In the present study, by analysing coreceptor tropism determinants in CCR5-using HIV-1 sequences we show that an adaptive evolution of coreceptor tropism occurred during the HIV-1 epidemic in various HIV subtypes.

It is well known that a high PSSM score and a high net charge of V3 define a X4 sequence. In this regard, PSSM and net charge of V3 both serve as tropism prediction algorithms for HIV [23,33] and are applied on every HIV-1 subtype. PSSM, the position specific scoring matrix, gives a score corresponding to the relative abundance of X4-like mutations in a given sequence, these mutations that are necessary for the recognition of CXCR4 or CCR5 [23]. Similarly, a high net charge of V3 is thought to confer a better binding of V3 to CXCR4 as this coreceptor is negatively charged as opposed to CCR5 that is positively charged [34]. Here we investigated PSSM and V3 in contemporary versus early R5 HIV sequences and found that a high PSSM score as well as high net charge of V3 characterized contemporary R5 sequences as opposed to earlier R5 sequences in subtypes C and D. In subtype B, we found an increase in the PSSM score with the age of the epidemic, but no significant change in V3 net charge was observed.

We can assume that, this evolution of coreceptor tropism determinants in these isolates was a consequence of transmission events. Indeed, Edo-Matas *et al.* have shown in a single donor-recipient pair that late stage characteristics of the donor's virus such as higher PSSM score and higher V3 charge was transmitted to the recipient [35]. In this transmission pair, X4 viruses later emerged in the recipient but not in the donor.

We also investigated coreceptor tropism determinants in other regions of *env* such as V1 and V2. The length of V1V2 as well as the number of PNGS in this region was investigated in R5 and X4 viruses. In the present study, we found that X4 sequences were characterized by longer V1V2 in all 3 subtypes analysed. Fewer PNGS were a significant characteristic of X4 viruses in subtype B, only a trend was found in subtype C while in subtype D the contrary was found. Long V1V2 and high number of PNGS have been associated with X4 viruses principally in subtype C viruses but not only, in the literature [28,36,37]. These characteristics can be associated to late-stage disease. Indeed, in an individual, a dramatic elongation of V1V2 concomitantly with addition of PNGS characterizes the first years of the infection, while in



later stages (*i.e.* after 6 years post seroconversion or more), the slowing down of the humoral immune response is accompanied by shortening and loss of PNGS in V1V2 in later and terminal stages [38]. However, despite this reversion, in the majority of cases, very late-stage viruses do not go back to their initial length and number of PNGS [4]. Heavy glycosylation contributes to the efficacy of viral infection, but it is also helpful to evade immune surveillance [4,39]. In addition to conformational constraints, it has been proposed that the V3 region of X4 variants is more susceptible to antibody neutralization than the V3 of R5 variants [9]. Therefore, the lengthening of V1-V2 but also the addition of PNGS could serve to shield V3 and increase viral fitness [40,41]. Similarly to X4 viruses, contemporary R5 sequences harboured longer V1V2 regions and higher numbers of PNGS as compared to earlier R5 sequences. These results are in agreement with the study from Bunnik *et al.* who demonstrated the elongation of V1V2 and addition of PNGS in this region with the aging epidemic, which resulted greater neutralisation resistance of contemporary viruses [16]. Interestingly, we found a positive correlation between length of V1 and the PSSM scores in R5 viruses while no association could be made with numbers of PNGS. We can hypothesise that the concomitant evolution of coreceptor tropism and length of V1V2 might be associated and not simply be 2 independent events. Indeed, the elongation of V1 could serve as a shield for the V3 of R5 viruses against humoral response, which could allow contemporary R5 viruses to develop mutations that are able to confer the X4 tropism. Interestingly, Bunnik *et al.* have found the largest changes in the V1 loop, which is the prime target of the autologous Nab response and is thought to protect underlying vulnerable epitopes from antibody recognition, and here we find that the V1 length is the only parameter that was strongly associated with PSSM scores in all the subtypes studied. This suggests that there is clearly an association between the emergence of X4 variants and the elongation of V1. Long V1 could protect V3 from NAb so that the protected V3 can evolve to harbour X4-like mutations. Indeed the new crystal structure of env shows that conformation of V1V2 shielding V3, which lies underneath V1V2 [42,43].

The last coreceptor determinant that we analysed was the V2 primary structure. V2 likelihood indexes were computed to monitor the evolution of amino acid substitutions in V2 sequences. Similarly to a PSSM score, the V2 likelihood index reflects the relative frequency of X4-related substitutions in a given V2 sequence. Calculations based on a reference dataset showed

that the V2 index is higher in X4 variants than in R5 variants. When we compared contemporary to early R5 sequences we found, as expected, higher V2 likelihood indexes in contemporary sequences as opposed to early sequences in all 3 subtypes. This finding goes in the line of what was found in V3 and V1V2 (see above). On the whole, these results indicate that the presence of amino acid substitutions consistent with the evolution of coreceptor tropism toward CXCR4 can be observed in V2 over the years. However, whether these mutations are directly responsible for a switch in phenotype is still unclear. They could also represent gain-of-fitness mutations that compensate for fitness losses induced by other amino acid substitutions that are directly responsible for coreceptor switching, as previously discussed by Pastore *et al.* [29].

Altogether, these results show an accumulation of X4-related mutations in R5 viruses during the HIV-1 epidemic indicating a coreceptor use adaptation at the population level in various HIV-1 subtypes.

The main limitation to this study was the lack of sequences available in the databases that matched our initial inclusion criteria: a) R5 isolates, b) length of the fragment of *env* studied (V1-V3) and c) early/acute stage of the disease. Therefore, only sequences from subtype B were from samples collected within the first 4.5 months following seroconversion [16]. For subtypes C and D, disease stage was not known. Also, very early sequences (before 1990) were not available for subtypes C and D either as opposed to subtype B, which did not allow us to make a standard stratification of the sequences that could be applied to every subtype. Nevertheless, the same results were found in all 3 subtypes regarding evolution of coreceptor tropism during the epidemic.

Although this preliminary study calls for further investigation, the possible adaptation of HIV-1 coreceptor tropism at the population level could explain many observations that have been made during the HIV-1 epidemic. Indeed, an increase in the prevalence of X4 variants during late-stage disease have been observed over the years in subtypes C [18,20], A and CRF\_02AG [19] indicating an evolving epidemic in those subtypes. Furthermore, a Spanish group reported recently a rise in X4 tropic viruses in recent HIV-1 seroconverters [44]. In fact, we can easily understand that in a subject who would be infected with a contemporary R5 strain, the mutational pathway to reach the coreceptor switch would be shorter than what could be observed in a recipient infected with an early HIV-1 strain; thus leading to an increasing

occurrence of switch at the population level in an aging epidemic. In this regard, Schuitemaker *et. al* proposed a hypothetical model of the evolutionary dynamics of CXCR4 usage in relation to the age of each HIV-1 subtype epidemic [45]. In this model they stated that subtype-D epidemic, which has the highest prevalence of X4 variants, is one of the oldest, while the subtype-C epidemic, which has a much lower prevalence of X4 variants, is considered one of the most recently emerged [46,47]. Subtype-B HIV-1 epidemic on the other hand has an intermediate pattern, both in terms of age and prevalence of X4 HIV-1 [7,45]. The increased emergence of X4 viruses at late-stage disease concomitantly to an increased neutralisation resistance of contemporary viruses at the population level may be of particular importance for HIV-1 therapy due to the introduction of CCR5-antagonists but also for the development of vaccines.

## REFERENCES

1. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271: 1582-1586.
2. Ross HA, Rodrigo AG (2002) Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J Virol* 76: 11715-11720.
3. Williamson S (2003) Adaptation in the env gene of HIV-1 and evolutionary theories of disease progression. *Mol Biol Evol* 20: 1318-1325.
4. Bunnik EM, Pisas L, van Nuenen AC, Schuitemaker H (2008) Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82: 7932-7941.
5. Kaleebu P, Nankya IL, Yirrell DL, Shafer LA, Kyosiimire-Lugemwa J, et al. (2007) Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 28-33.
6. Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, Orlovic D, Ketas T, et al. (2003) The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol* 77: 4449-4456.

7. Gilbert MT, Rambaut A, Wlasiuk G, Spira TJ, Pitchenik AE, et al. (2007) The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18566-18570.
8. Harouse JM, Buckner C, Gettie A, Fuller R, Bohm R, et al. (2003) CD8+ T cell-mediated CXCR4 chemokine receptor 4-simian/human immunodeficiency virus suppression in dually infected rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10977-10982.
9. Bunnik EM, Quakkelaar ED, van Nuenen AC, Boeser-Nunnink B, Schuitemaker H (2007) Increased neutralization sensitivity of recently emerged CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 strains compared to coexisting CCR5-using variants from the same patient. *J Virol* 81: 525-531.
10. Coetzer M, Cilliers T, Ping LH, Swanstrom R, Morris L (2006) Genetic characteristics of the V3 region associated with CXCR4 usage in HIV-1 subtype C isolates. *Virology* 356: 95-105.
11. Mild M, Gray RR, Kvist A, Lemey P, Goodenow MM, et al. (2013) High inpatient HIV-1 evolutionary rate is associated with CCR5-to-CXCR4 coreceptor switch. *Infect Genet Evol* 19: 369-377.
12. Hoffman NG, Seillier-Moisewitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R (2002) Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol* 76: 3852-3864.
13. Boyd MT, Simpson GR, Cann AJ, Johnson MA, Weiss RA (1993) A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J Virol* 67: 3649-3652.
14. Dunfee RL, Thomas ER, Wang J, Kunstman K, Wolinsky SM, et al. (2007) Loss of the N-linked glycosylation site at position 386 in the HIV envelope V4 region enhances macrophage tropism and is associated with dementia. *Virology* 367: 222-234.
15. Ransy DG, Motorina A, Merindol N, Akouamba BS, Samson J, et al. (2013) Evolution of HIV-1 coreceptor usage and coreceptor switching during pregnancy. *AIDS Res Hum Retroviruses*.
16. Bunnik EM, Euler Z, Welkers MR, Boeser-Nunnink BD, Grijzen ML, et al. (2010) Adaptation of HIV-1 envelope gp120 to humoral immunity at a population level. *Nat Med* 16: 995-997.

17. Bouvin-Pley M, Morgand M, Moreau A, Jestin P, Simonnet C, et al. (2013) Evidence for a continuous drift of the HIV-1 species towards higher resistance to neutralizing antibodies over the course of the epidemic. *PLoS Pathog* 9: e1003477.
18. Connell BJ, Michler K, Capovilla A, Venter WD, Stevens WS, et al. (2008) Emergence of X4 usage among HIV-1 subtype C: evidence for an evolving epidemic in South Africa. *AIDS* 22: 896-899.
19. Esbjornsson J, Mansson F, Martinez-Arias W, Vincic E, Biague AJ, et al. (2010) Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02\_AG during late-stage disease-- indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology* 7: 23.
20. Gupta S, Neogi U, Srinivasa H, Banerjea AC, Shet A (2013) HIV-1 co-receptor tropism in India: increasing proportion of X4-tropism in subtype C strains over two decades. *J Acquir Immune Defic Syndr*.
21. databases H <http://www.hiv.lanl.gov/>.
22. Gaschen B, Kuiken C, Korber B, Foley B (2001) Retrieval and on-the-fly alignment of sequence fragments from the HIV database. *Bioinformatics* 17: 415-418.
23. Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, et al. (2003) Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* 77: 13376-13388.
24. Jensen MA, Coetzer M, van 't Wout AB, Morris L, Mullins JI (2006) A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol* 80: 4698-4704.
25. Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, et al. (2004) Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* 14: 1229-1246.
26. Thielen A, Sichtig N, Kaiser R, Lam J, Harrigan PR, et al. (2010) Improved prediction of HIV-1 coreceptor usage with sequence information from the second hypervariable loop of gp120. *J Infect Dis* 202: 1435-1443.
27. Groenink M, Fouchier RA, Broersen S, Baker CH, Koot M, et al. (1993) Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration. *Science* 260: 1513-1516.

28. Fouchier RA, Broersen SM, Brouwer M, Tersmette M, Van't Wout AB, et al. (1995) Temporal relationship between elongation of the HIV type 1 glycoprotein 120 V2 domain and the conversion toward a syncytium-inducing phenotype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1473-1478.
29. Pastore C, Nedellec R, Ramos A, Pontow S, Ratner L, et al. (2006) Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations. *J Virol* 80: 750-758.
30. Jansson M, Backstrom E, Scarlatti G, Bjorndal A, Matsuda S, et al. (2001) Length variation of glycoprotein 120 V2 region in relation to biological phenotypes and coreceptor usage of primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: 1405-1414.
31. Labrosse B, Treboute C, BreLOT A, Alizon M (2001) Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor. *J Virol* 75: 5457-5464.
32. Ogert RA, Lee MK, Ross W, Buckler-White A, Martin MA, et al. (2001) N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* 75: 5998-6006.
33. Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, et al. (2008) Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* 22: F11-16.
34. Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP (2005) V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21: 171-189.
35. Edo-Matas D, Rachinger A, Setiawan LC, Boeser-Nunnink BD, van 't Wout AB, et al. (2012) The evolution of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) envelope molecular properties and coreceptor use at all stages of infection in an HIV-1 donor-recipient pair. *Virology* 422: 70-80.
36. Dash PK, Siddappa NB, Mangaiarkarasi A, Mahendarkar AV, Roshan P, et al. (2008) Exceptional molecular and coreceptor-requirement properties of molecular clones isolated from an Human Immunodeficiency Virus Type-1 subtype C infection. *Retrovirology* 5: 25.

37. Coetzer M, Nedellec R, Cilliers T, Meyers T, Morris L, et al. (2011) Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. *J Acquir Immune Defic Syndr* 56: 9-15.
38. Borggren M, Repits J, Sterjovski J, Uchtenhagen H, Churchill MJ, et al. (2011) Increased sensitivity to broadly neutralizing antibodies of end-stage disease R5 HIV-1 correlates with evolution in Env glycosylation and charge. *PLoS One* 6: e20135.
39. Sagar M, Wu X, Lee S, Overbaugh J (2006) Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J Virol* 80: 9586-9598.
40. Losman B, Bolmstedt A, Schonning K, Bjorndal A, Westin C, et al. (2001) Protection of neutralization epitopes in the V3 loop of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 by N-linked oligosaccharides in the V1 region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: 1067-1076.
41. Pinter A, Honnen WJ, He Y, Gorny MK, Zolla-Pazner S, et al. (2004) The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J Virol* 78: 5205-5215.
42. Lyumkis D, Julien JP, de Val N, Cupo A, Potter CS, et al. (2013) Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342: 1484-1490.
43. Julien JP, Cupo A, Sok D, Stanfield RL, Lyumkis D, et al. (2013) Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342: 1477-1483.
44. Sierra-Enguita R, Rodriguez C, Aguilera A, Gutierrez F, Eiros JM, et al. (2014) X4 tropic viruses are on the rise in recent HIV-1 seroconverters in Spain. *AIDS* 28: 1603-1609.
45. Schuitemaker H, van 't Wout AB, Lusso P (2011) Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *J Transl Med* 9 Suppl 1: S5.
46. Gray RR, Tatem AJ, Lamers S, Hou W, Laeyendecker O, et al. (2009) Spatial phylodynamics of HIV-1 epidemic emergence in east Africa. *AIDS* 23: F9-F17.
47. Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, et al. (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455: 661-664.





|   |                   | Lenght    |        |          | Number of PNGS |        |        |
|---|-------------------|-----------|--------|----------|----------------|--------|--------|
|   |                   | V1        | V2     | V1V2     | V1             | V2     | V1V2   |
| <b>Subtype B (PSSM<sub>R5X4</sub>)</b>  | <i>Spearman r</i> | 0.329     | -0.018 | 0.097    | 0.005          | 0.014  | -0.026 |
|   | <i>P value</i>    | ***0.0001 | 0.424  | 0.148    | 0.479          | 0.438  | 0.390  |
| <b>Subtype C (PSSM<sub>SINSI</sub>)</b> | <i>Spearman r</i> | 0.168     | 0.075  | 0.182    | -0.011         | -0.049 | -0.022 |
|   | <i>P value</i>    | **0.002   | 0.099  | ***0.001 | 0.848          | 0.394  | 0.704  |
| <b>Subtype D (PSSM<sub>R5X4</sub>)</b>  | <i>Spearman r</i> | 0.180     | -0.012 | 0.130    | 0.027          | 0.027  | 0.027  |
|   | <i>P value</i>    | **0.009   | 0.438  | *0.045   | 0.363          | 0.363  | 0.363  |

**Table 1. Correlation between the length and number of PNGS in V1V2 with PSSM scores in HIV-1.**

The spearman *r* and *p*-values (one tailed) are represented.  $P < 0.05$  is considered as significant.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Length and number of PNGS of V1V2 in R5 versus X4 viruses.** The length (A) and numbers of PNGS (B) were assessed in the V1V2 region from subtypes B, C and D sequences of R5 and X4 tropism. Tuckey representation, dots represent outlier values, “+” represents mean values. P values for the Mann Whitney *U* test are represented.  $P < 0.05$  is considered as significant.

**Figure 2. Computation of V2 likelihood index and comparison between R5 and X4 viruses.** (A) Differential frequencies of amino acid substitutions found in V2 as a function of viral tropism. The V2 sequence of HXB2 reference sequence is presented. Positions in yellow are those that are included in the computation of the likelihood index. (B) V2 likelihood indexes were computed in V2 sequences of R5 and X4 tropism. Tuckey representation, dots represent outlier values, “+” represents mean values. P values for the Mann Whitney *U* test are represented.  $P < 0.05$  is considered as significant.

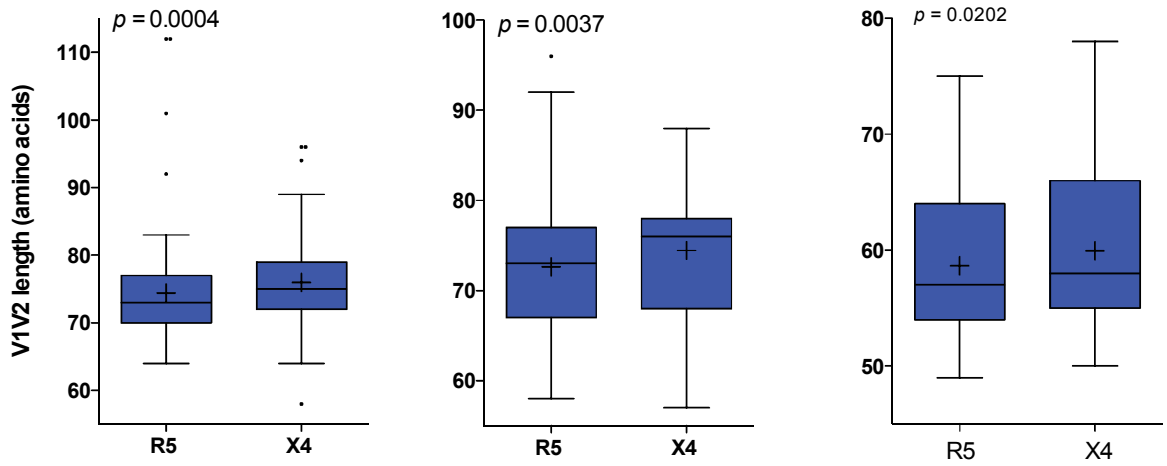
**Figure 3. PSSM scores and net charge of V3 in ancient versus contemporary R5 sequences.** The PSSM scores (A) and net charge of V3 (B) were assessed in R5 sequences of subtypes B, C and D and compared between ancient (before the year 2000) and contemporary (after the year 2000) R5 sequences. Sequences from subtypes B were obtained within primary infection of the virus donor, so the year of virus isolation represents the year of seroconversion (SC). Tuckey representation, dots represent outlier values, “+” represents mean values. P values for the Mann Whitney *U* test are represented.  $P < 0.05$  is considered as significant.

**Figure 4. V1V2 length and PNGS in ancient versus contemporary R5.** The length (A) and the number of PNGS (B) were assessed in the V1V2 region of R5 sequences from subtypes B, C and D and compared between ancient (before the year 2000 – dark blue) and contemporary (after the year 2000 - light blue) R5 sequences. Sequences from subtypes B were obtained within primary infection of the virus donor, so the year of virus isolation represents the year of seroconversion (SC). Tuckey representation, dots represent outlier values, “+” represents mean values. P values for the Mann Whitney *U* test are represented.  $P < 0.05$  is considered as significant.

**Figure 5. V2 likelihood indexes in ancient versus contemporary R5 sequences.** V2 likelihood indexes were assessed in R5 sequences of subtypes B, C and D and compared between ancient (before the year 2000) and contemporary (after the year 2000) R5 sequences. Sequences from subtypes B were obtained within primary infection of the virus donor, so the year of virus isolation represents the year of seroconversion (SC). Tuckey representation, dots represent outlier values, “+” represents mean values. P values for the Mann Whitney *U* test are represented.  $P < 0.05$  is considered as significant.

**Figure 1.**

**A**



**B**

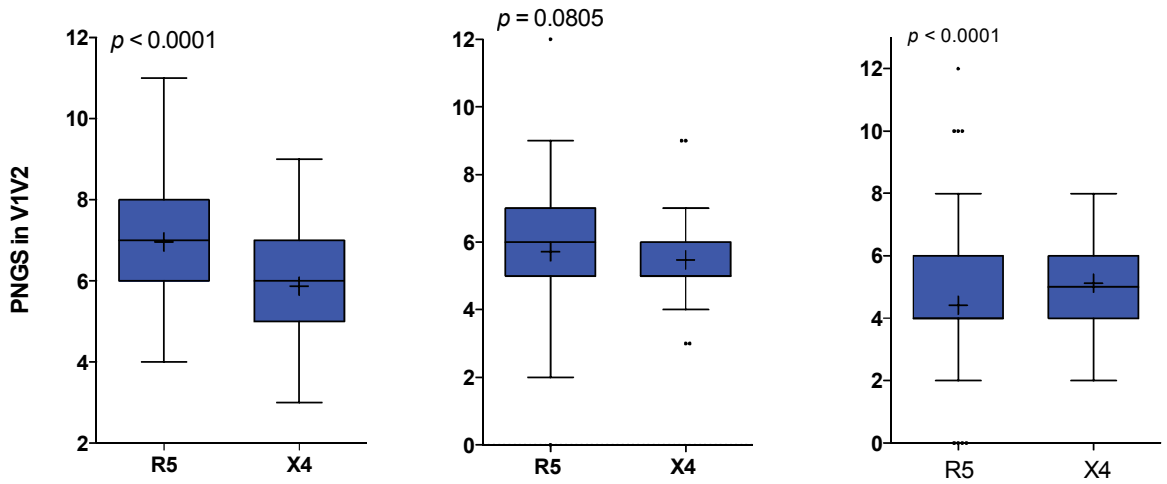
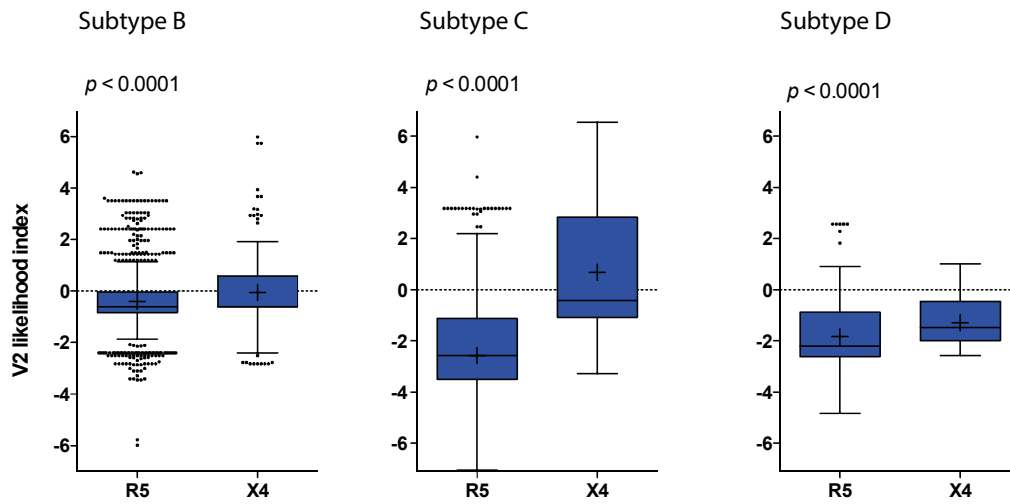


Figure 2.

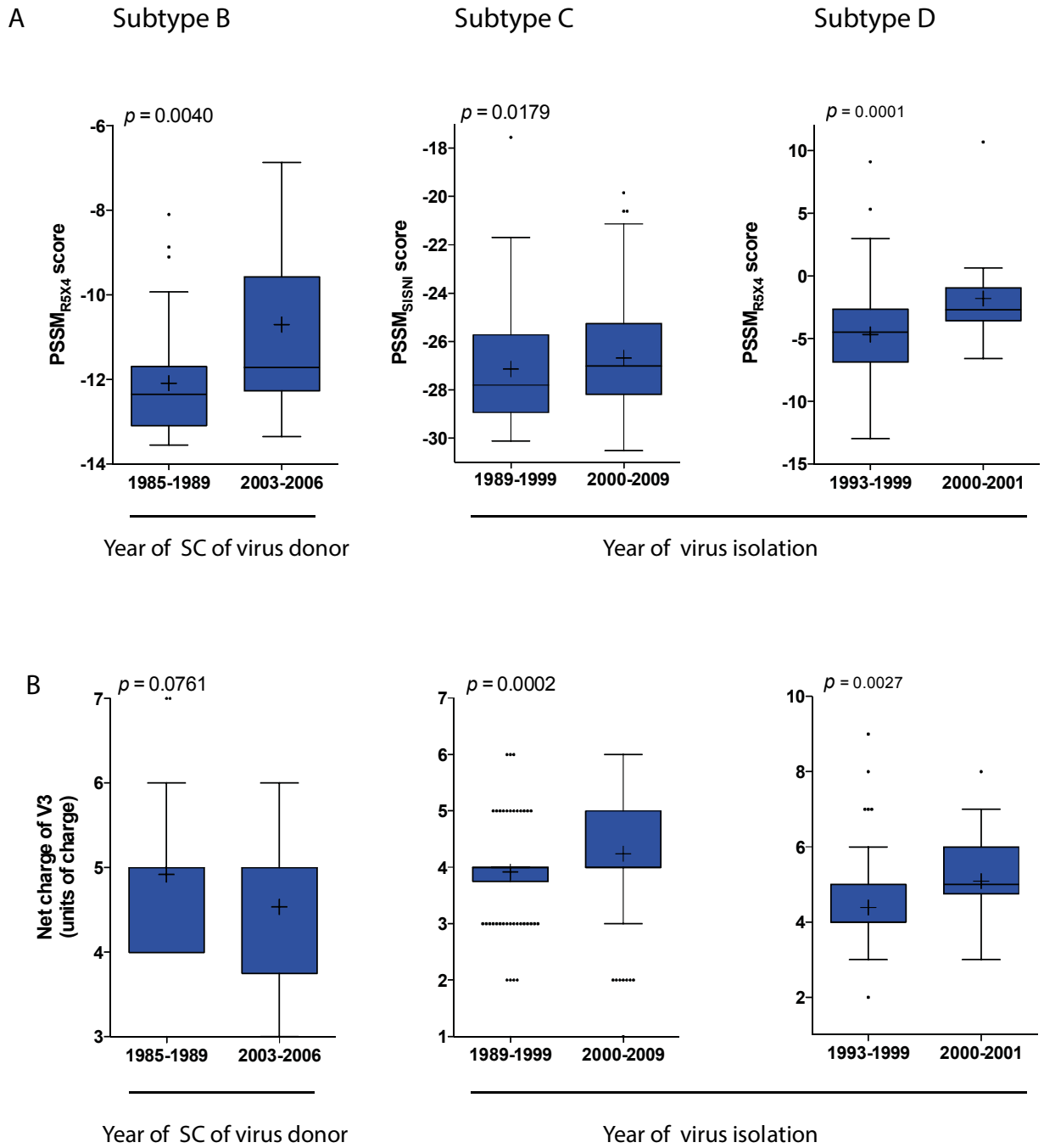
A

|                     | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166  | 167  | 168 | 169 | 170 | 171 | 172  | 173 | 174 | 175 | 176  | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188  | 189 | 190 | 191  | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                     | S   | F   | N   | S   | T   | S   | S   | I   | R    | G    | K   | V   | Q   | K   | E    | V   | A   | F   | F    | Y   | K   | L   | D   | I   | P   | T   | D   | N   | D   | T   | I    | S   | Y   | K    | L   | I   | S   | C   |     |
| Substitution        |     |     | A   |     |     | V   | E   | L   | L    | K    |     | T   | K   |     | Y    | H   |     |     | Y    |     |     |     |     | E   | L   |     |     |     |     |     |      | X   | R/K | X    | R   | L   |     | N   | H   |
| Frequency in R5 (%) |     |     | 8.1 |     |     | 4.2 | 5.5 | 4.0 | 13.3 | 1.2  |     | 0.4 | 2.5 |     | 7.2  | 14  |     |     | 9.7  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 15.3 | 4   | 3   | 8.7  | 5.5 |     | 5.9 | 2.5 |     |
| Frequency in X4 (%) |     |     | 1.1 |     |     | 11  | 21  | 25  | 7.7  | 2    |     | 13  | 2.5 |     | 5.5  | 2.7 |     |     | 8.9  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1.2  | 23  | 1.8 | 6.8  | 1.5 |     | 4.5 | 1.5 |     |
| LN (X4/R5)          |     |     | -2  |     |     | 1   | 0.6 | 0.5 | 1.8  | -1.8 |     | 3.4 | 0.6 |     | -0.3 | 0.6 |     |     | -0.1 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | -1   | 3.7 | 1.6 | -0.2 | 1   |     | 0.4 | 1.8 |     |

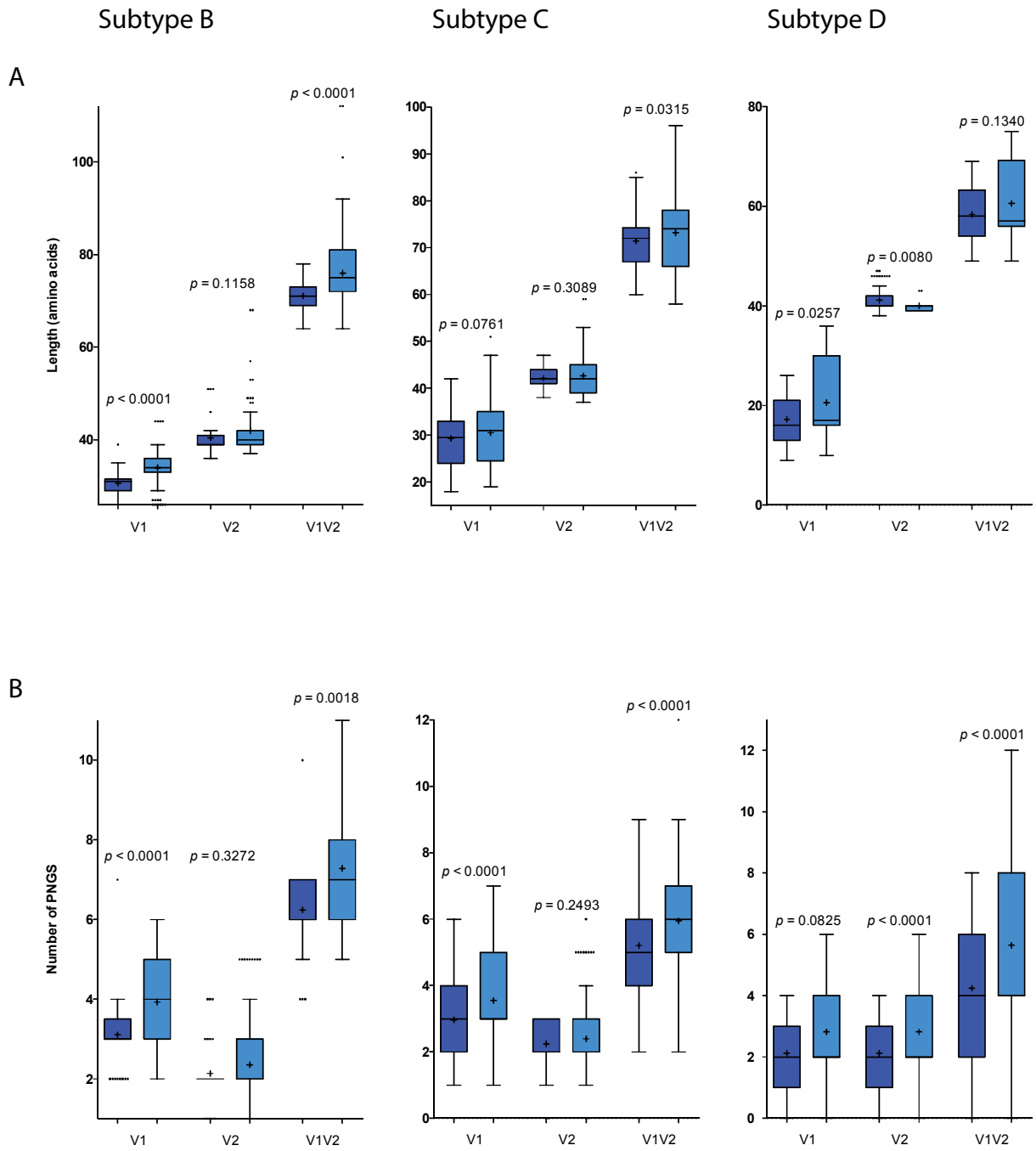
B



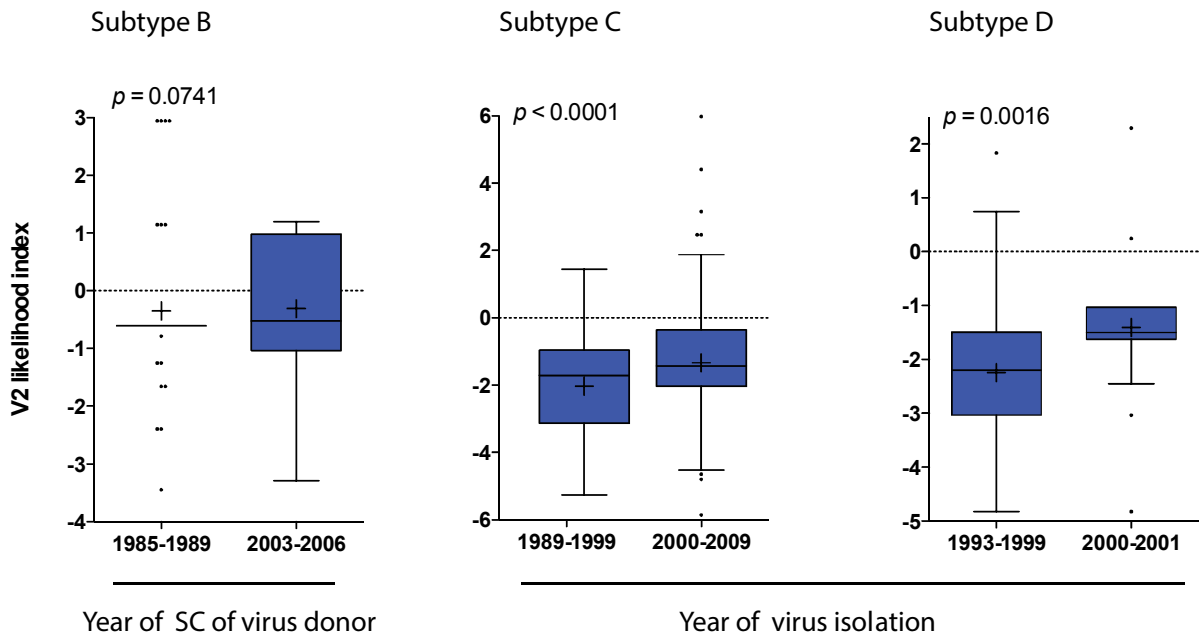
**Figure 3.**



**Figure 4.**



**Figure 5.**



## **DISCUSSION**



Les dynamiques d'adaptation du VIH-1 impliquent l'évolution constante des gènes viraux sous la pression persistante des réponses à médiation cellulaire et humorale. La grossesse étant associée à des changements qualitatifs et quantitatifs de l'immunité maternelle, il est important de mieux comprendre les effets de la grossesse sur l'évolution du VIH-1 et sur la progression de la maladie.

Les deux premiers chapitres de cette thèse de doctorat adressent les questions de l'évolution du tropisme et de la pression immunitaire exercée sur les gènes viraux au cours de la grossesse. Le 3<sup>ème</sup> chapitre de cette thèse, lui, s'ouvre sur une étude plus large non restreinte à la gestation, mais pose la question de l'évolution du tropisme du virus à l'échelle de la population.

## **1. Évolution du tropisme du VIH-1 au cours de la grossesse**

Le but de cette première étude était de documenter l'évolution du tropisme du VIH-1, de l'utilisation de CCR5 vers l'utilisation de CXCR4 au cours de la grossesse chez 19 patientes infectées par le VIH-1 de sous-types A1, B, C, D et CRF13\_cpx.

### **1.1. La présence de séquence X4 est détectée chez la moitié des sujets de notre cohorte**

Dans un premier temps, le tropisme des virus plasmatiques des 19 patientes fut déterminé à l'aide des algorithmes de prédiction PSSM<sub>X4R5</sub> et geno2pheno (avec un taux de faux positif de 5.75%; G2P<sub>5.75</sub>). Les algorithmes nous ont permis de classifier 47.4% des patientes (9 sur 19) comme étant des sujets X4, c'est-à-dire des individus chez lesquels des séquences X4 ont été détectées par au moins un des deux algorithmes. Les 10 sujets restants étant par opposition appelés sujets R5 (52,6%) (Figure 22). Les séquences X4 ont été retrouvées chez tous les sous-types étudiés.

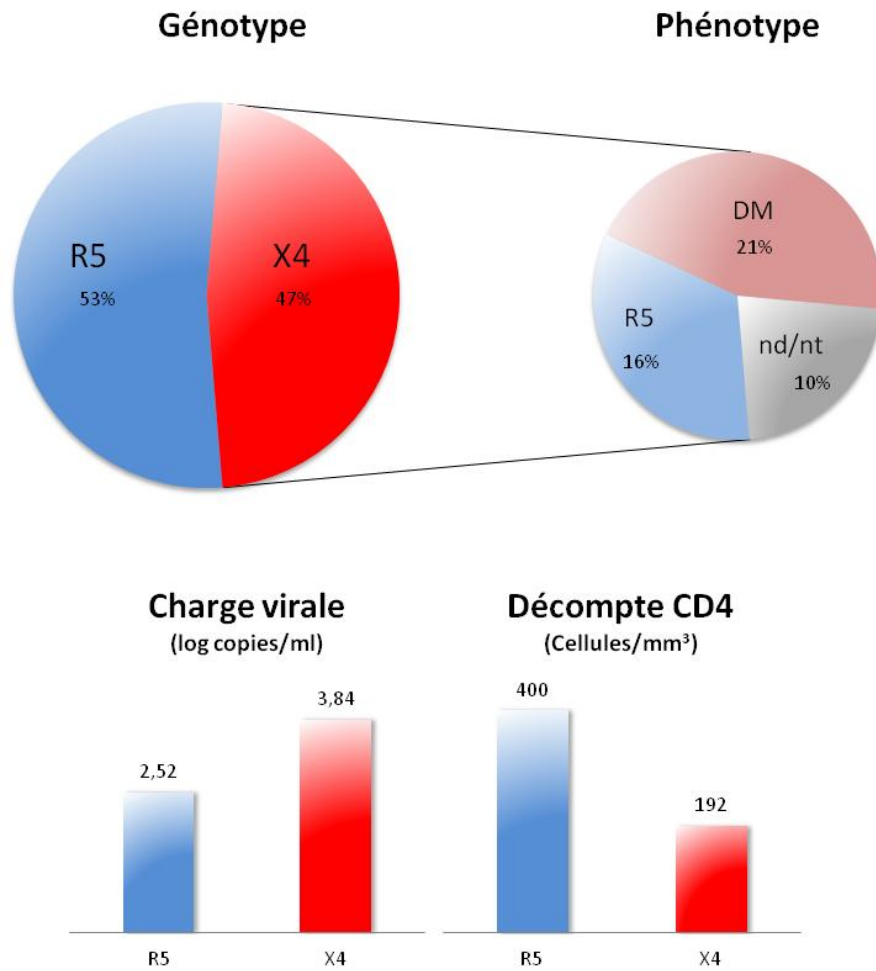
La littérature rapporte une prévalence de virus X4 de 50% chez les sujets infectés par le sous-type B (Abebe *et al.* 1999; Bratt *et al.* 1998; Cilliers *et al.* 2003; Coetzer *et al.* 2006; Kaleebu *et al.* 2007; Yu *et al.* 1995) et de 30% chez les porteurs du sous-type C (Connell *et al.* 2008). Ceci est en accord avec les résultats que nous rapportons ici concernant le génotype : en effet, 40% (4 sujets sur 10) des sujets infectés par le sous-type B et 33% (2 sujets sur 6) des individus infectés par le sous-type C ont été classifiés comme sujets X4.

Le test phénotypique Trofile de Monogram® a ensuite été effectué sur les virus des sujets X4 afin de confirmer le phénotype X4. Un échantillon bitropique (R5X4) est appelé DM, pour «dual-mixed», par opposition à un échantillon monotropique (R5 ou X4). Le phénotypage a pu être réalisé chez 7 sujets X4 et a confirmé la présence de virus DM chez 4 de ces sujets, alors que 3 sujets ont été classifiés comme R5 par cette technique (Figure 22). Les discordances entre génotype et phénotype peuvent être expliquées par la longueur de la boucle V3, une boucle plus longue ou plus courte entraînant des mésalignements, ou encore des séquences avec des scores intermédiaires pour PSSM par exemple.

Bien que les algorithmes soient discordants et que le Trofile ne confirme le tropisme que chez 4 sujets (il faut rappeler que dans le cas de 2 patientes, les échantillons n'ont pas pu être testés et les tests ont été non-concluants selon les échantillons), les patientes discordantes sont très certainement des patientes qui possèdent des séquences X4. En effet, les tests génotypiques se sont montrés concluants concernant le pronostic des patientes sous antagonistes de CCR5 et semblent prédire efficacement la probabilité de rechute (Harrigan and Geretti 2011). Les tests génotypiques seraient ainsi plus sensibles que les tests phénotypiques utilisés. G2P<sub>[coreceptor]</sub> et PSSM ont tous deux montré une bonne valeur prédictive quant à la réponse au traitement avec le maraviroc chez les patients, bien que de nombreuses évidences supportent la préférence de G2P<sub>[coreceptor]</sub> pour utilisation en clinique (Harrigan and Geretti 2011; Svicher *et al.* 2013).

De plus, en accord avec la littérature suggérant que les variants X4 sont caractéristiques des stades plus avancés de la maladie (Berger *et al.* 1999; Bratt *et al.* 1998), nos patientes X4 présentaient des décomptes de LTCD4<sup>+</sup> plus bas et une charge virale plus élevée que les patientes R5. Toutefois, chez nos sujets, le moment de la séroconversion n'était pas connu. Les femmes de notre cohorte étant diagnostiquées pour la plupart au cours de la grossesse, la

possibilité que les sujets X4 aient été infectés pour une plus longue période que les sujets R5 ne peut être exclue.



**Figure 22. Tropisme et caractéristiques cliniques des sujets de notre cohorte.**

Génotype et phénotype des virus des sujets de la cohorte (panel du haut). nt/nd : non-testé/non-déterminé. Charge virale et décompte des cellules T CD4<sup>+</sup> chez les sujets de génotype R5 et X4 (panel du bas).

## **1.2. L'évolution du tropisme est retrouvé uniquement chez les sujets X4**

Nous avons par la suite examiné l'évolution du tropisme en mesurant l'évolution de la fréquence de séquences X4 ainsi que les déterminants moléculaires du tropisme au cours du temps.

Premièrement, l'évolution de la fréquence des séquences prédites comme étant X4 au cours du temps a été investiguée chez les sujets X4 et nous avons observé une augmentation de cette fréquence chez 4 de ces sujets (Figure 23). Une patiente a montré un switch de R5 vers R5X4 au 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse et une autre a montré une réversion de tropisme de R5X4 vers R5 au 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse également. Les 3 autres sujets X4 arboraient une fréquence relativement stable allant parfois jusqu'à 100% de séquences X4 tout au long de la grossesse.

Dans un deuxième temps, l'évolution des déterminants moléculaires du tropisme dans V1, V2 et V3 a été analysée. Nous avons pu observer l'évolution des déterminants du tropisme vers une accumulation de mutations associées au tropisme X4, et ce, en concordance avec l'augmentation de la fréquence de séquences X4 chez certains sujets (Figure 23). Les différents paramètres analysés étaient les scores individuels des algorithmes PSSM et G2P, la charge nette de V3, la longueur et le nombre de sites de N-glycosylation dans V1V2, et enfin les mutations dans V2 auxquelles nous avons attribuées un score. Une évolution de tous ces paramètres vers une utilisation plus grande de CXCR4 au cours du temps dans les populations virales a été observée chez 5 sujets X4 mais chez aucun sujet R5 (Figure 23).

La charge nette de V3 est l'un des déterminants principaux du tropisme (De Jong *et al.* 1992; Mild *et al.* 2010) et le switch du tropisme de R5 vers X4 est associé à une augmentation de la charge positive de V3 qui est nécessaire aux interactions électrostatiques entre V3 (positivement chargée) et CXCR4 (négativement chargé) (Coetzer *et al.* 2006; Fouchier *et al.* 1992; Kwong *et al.* 2000). Ces résultats sont également concordants avec les résultats de Mild *et al.* qui ont montré une augmentation de la charge de V3 au cours du temps dans les

populations virales en switch versus les population virale non-switch (Mild *et al.* 2010). Cette augmentation de la charge était accompagnée d'une diminution du taux de faux positif de G2P et d'une augmentation de la valeur numérique des scores PSSM<sub>X4R5</sub> chez ces sujets, ce qui représente une accumulation de mutations X4 au cours de temps.

De façon similaire à V3, mais toutefois avec une influence moindre, les mutations dans V2 peuvent influencer le tropisme (Fouchier *et al.* 1995; Groenink *et al.* 1993; Hoffman *et al.* 2002; Jansson *et al.* 2001; Pastore *et al.* 2006; Thielen *et al.* 2010; Yen *et al.* 2014) Nous avons développé et calculé un index de mutations basé sur la méthode de PSSM. Plus cet index est élevé pour une séquence donnée, plus cette séquence se rapproche d'une séquence V2 de virus X4. Nous avons pu observer une augmentation de l'index de V2 chez 4 des 5 sujets qui avaient préalablement montré une évolution de la charge de V3, du score PSSM<sub>X4R5</sub> et du G2P FPR. De plus, l'élongation de V1V2 et l'addition de PNGS dans cette région a été observée chez deux patientes X4 infectées par le VIH-1 de sous-type C ainsi que chez une patiente infectée par le sous-type A1, ce qui est compatible avec les résultats de Coetzer *et al.* (2001) et de Dash *et al.* (2008) (Figure 23).

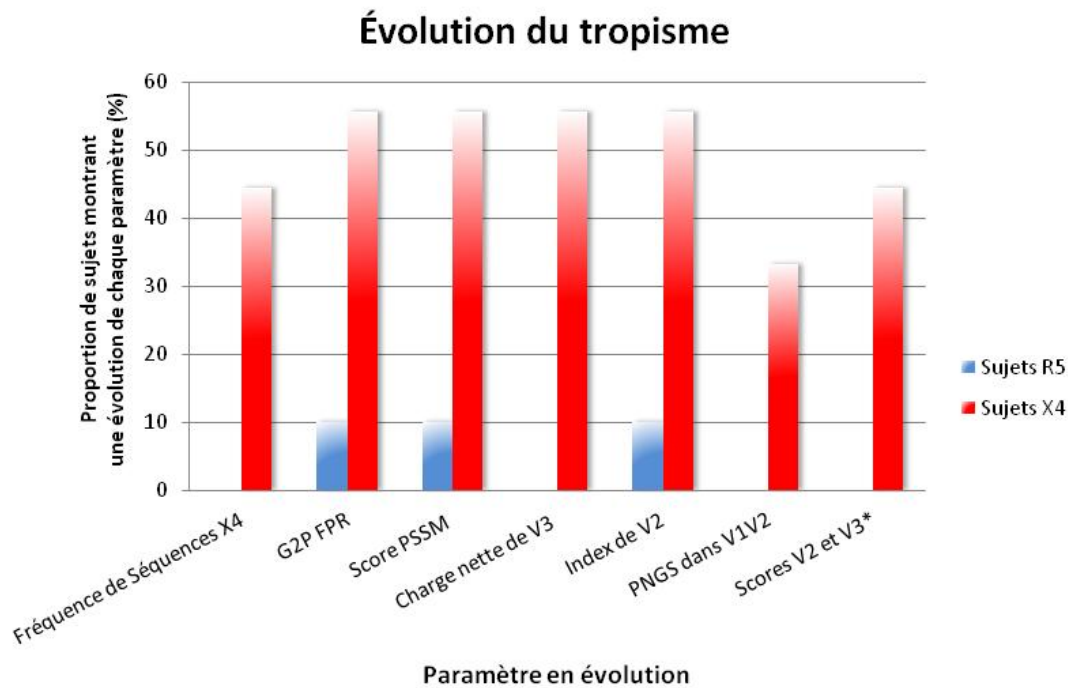
Enfin, le phénotypage n'a pas permis de déterminer l'évolution du tropisme. En effet, ce test permet uniquement de déterminer s'il y a un switch du tropisme, c'est-à-dire le passage d'un phénotype R5 à un phénotype DM ou X4, et vice-versa, mais ne permet pas de déterminer la fréquence relative des variants dans l'échantillon testé. Le test phénotypique de Monogram® utilisé ici permet uniquement de déterminer si un échantillon est bi-tropique (DM) ou monotropique (R5 ou X4). Il s'agit là d'une limite de la méthode utilisée. Il aurait été toutefois intéressant de confirmer nos observations génotypiques avec le phénotype. Afin d'aller plus loin et de pouvoir palier à cette lacune, il serait intéressant d'effectuer des tests quantitatifs permettant d'évaluer l'efficacité d'infection (infectivité) en utilisant des cellules exprimant CXCR4 ou CCR5 individuellement. La technique du *single genome amplification* suivie d'un test de Trofile sur chaque amplicon permettrait de déterminer la fréquence relative de clones viraux utilisant CXCR4 ou CCR5 dans le temps. Cette technique, en montrant une augmentation dans le temps de l'efficacité d'infection des cellules CXCR4<sup>+</sup> au détriment ou non des cellules CCR5<sup>+</sup>, permettrait d'évaluer la vitesse de progression de l'utilisation de CXCR4. Cette méthode, toutefois fastidieuse, est la meilleure pour avoir une description

phénotypique la plus précise possible de l'évolution du tropisme chez les patients. En effet, elle fournirait une meilleure description de la quasi-espèce en évitant d'une part le biais d'amplification rencontré lors de la PCR et en détectant les variants minoritaires (Butler *et al.* 2009). Une autre technique permettant d'étudier l'évolution du tropisme mais ceci sur un plan génétique uniquement est celle du séquençage en profondeur (*deep sequencing*) qui permettrait d'aller échantillonner les variants minoritaires (Sede *et al.* 2014).

L'évolution de ces paramètres est donc compatible avec une évolution progressive du tropisme du VIH-1 de l'utilisation de CCR5 vers CXCR4 au cours de la grossesse. À l'exception d'un cas non-confirmé (car non-testé) par le test phénotypique, cette évolution ne correspond pas à un « switch » proprement dit, qui consiste en l'apparition de séquences X4 dans une population R5, mais correspond plutôt à une étape intermédiaire du switch consistant en l'augmentation de l'utilisation de CXCR4 par la population virale au détriment des virus R5 après l'apparition préalable des virus X4. Tous les sujets X4 ayant reçu un traitement antirétroviral, ces résultats confirment l'indépendance entre le traitement antirétroviral, l'évolution du tropisme, et le switch d'utilisation de corécepteurs, tel que rapporté par le groupe d'Angarano (Saracino *et al.* 2009).

Alors que seule l'étude de Tscherning-Casper *et al.* (2000) témoigne l'évolution de l'utilisation des corécepteurs de CCR5 vers CXCR6 au cours de la grossesse, notre étude est la première à documenter l'évolution du tropisme et le switch de tropisme de R5 à R5/X4 et de R5/X4 à X4 chez les femmes enceintes infectées de surcroît avec un large éventail de sous-types du VIH-1. Dans l'ensemble, nos résultats sont compatibles avec la transmission des variants X4 de la mère à l'enfant au cours de la grossesse, qui a été rapportée par plusieurs groupes (Crudeli *et al.* 2012; Durik *et al.* 2012; Huang *et al.* 2009; Ometto *et al.* 2000; Salvatori and Scarlatti 2001; Scarlatti *et al.* 1993).

Ces observations nous amènent à la question suivante : Si la grossesse potentialise ou induit le switch de tropisme, quel pourrait être le mécanisme sous-jacent?



**Figure 23. Vue d'ensemble de l'évolution du tropisme vers l'utilisation de CXCR4 au cours de la grossesse tel qu'analysé dans notre cohorte.**

Évolution de différents paramètres définissant le tropisme chez les sujets R5 et X4. Une augmentation de la fréquence de séquences X4, du score PSSM, de la charge nette de V3, de l'index de vraisemblance de V2, de la longueur et du nombre de PNGS dans V1V2, et une diminution du taux de faux positif de G2P sont considérés comme une évolution vers l'utilisation de CXCR4. \*Scores V2 et V3 représente une évolution concomitante de G2P FPR, du score PSSM, de la charge nette de V3 ainsi que de l'index de V2 chez un même sujet.

### **1.3. L'immunité maternelle comme possible potentialisateur du switch en grossesse**

La grossesse est associée à des changements importants de la réponse immunitaire maternelle, changements que l'on pense essentiels à l'établissement et à la maintenance de la tolérance aux antigènes paternels exprimés par le fœtus (Billingham *et al.* 1953; Mor and Cardenas 2010). Au cours d'une grossesse normale, on observe une augmentation de la synthèse des immunoglobulines (Ig) totales (Bisset *et al.* 1990; Wilson *et al.* 2001). Ces taux d'Ig déclinent avec la progression de la grossesse en conséquence au transfert transplacentaire d'IgG qui

s'accélère vers la fin de la gestation (Brambell *et al.* 1954; Simister 2003). Ces changements complexes se déroulant au niveau de l'immunorégulation sont encore très mal compris (Munoz-Suano *et al.* 2011).

Une augmentation importante de la longueur des boucles hypervariables de l'enveloppe du VIH-1 est associée à une réponse humorale vigoureuse durant la primo-infection (Bunnik *et al.* 2008). Ainsi, il est possible que les changements génotypiques et phénotypiques que nous avons observés reflètent des modulations de la réponse VIH-spécifique associée à l'initiation et/ou à la progression de la grossesse, incluant une augmentation des réponses Th2 (Kwak-Kim *et al.* 2005; Narita *et al.* 2000; Raghupathy *et al.* 2000; Tranchot-Diallo *et al.* 1997; Wegmann *et al.* 1993). En effet, plusieurs maladies auto-immunes à médiation humorale, telles que le lupus érythémateux ou la thyroïdite auto-immunitaire, s'aggravent au cours de la grossesse (Brown *et al.* 2015; Garsenstein *et al.* 1962; Gomes *et al.* 2015). On peut donc postuler que l'émergence de variants X4 soit liée à un remodelage actif de la réponse anticorps VIH-spécifique associée à la grossesse (Figure 24). Il conviendrait de monitorer l'évolution de la spécificité des anticorps de la femme enceinte à la protéine de l'enveloppe. Ceci peut être fait par des tests de neutralisation *in vitro* des virus autologues (clones moléculaires exprimant l'enveloppe de la patiente) et hétérologues (clones moléculaires génériques) par le sérum des femmes enceintes à différents temps durant la grossesse (Sather *et al.* 2014). Il serait alors possible d'identifier les variants qui échappent à la réponse et de caractériser leurs mutations d'échappement. Ceci nous permettrait notamment de vérifier si les mutants d'échappement acquièrent préférentiellement des mutations conférant le tropisme X4.

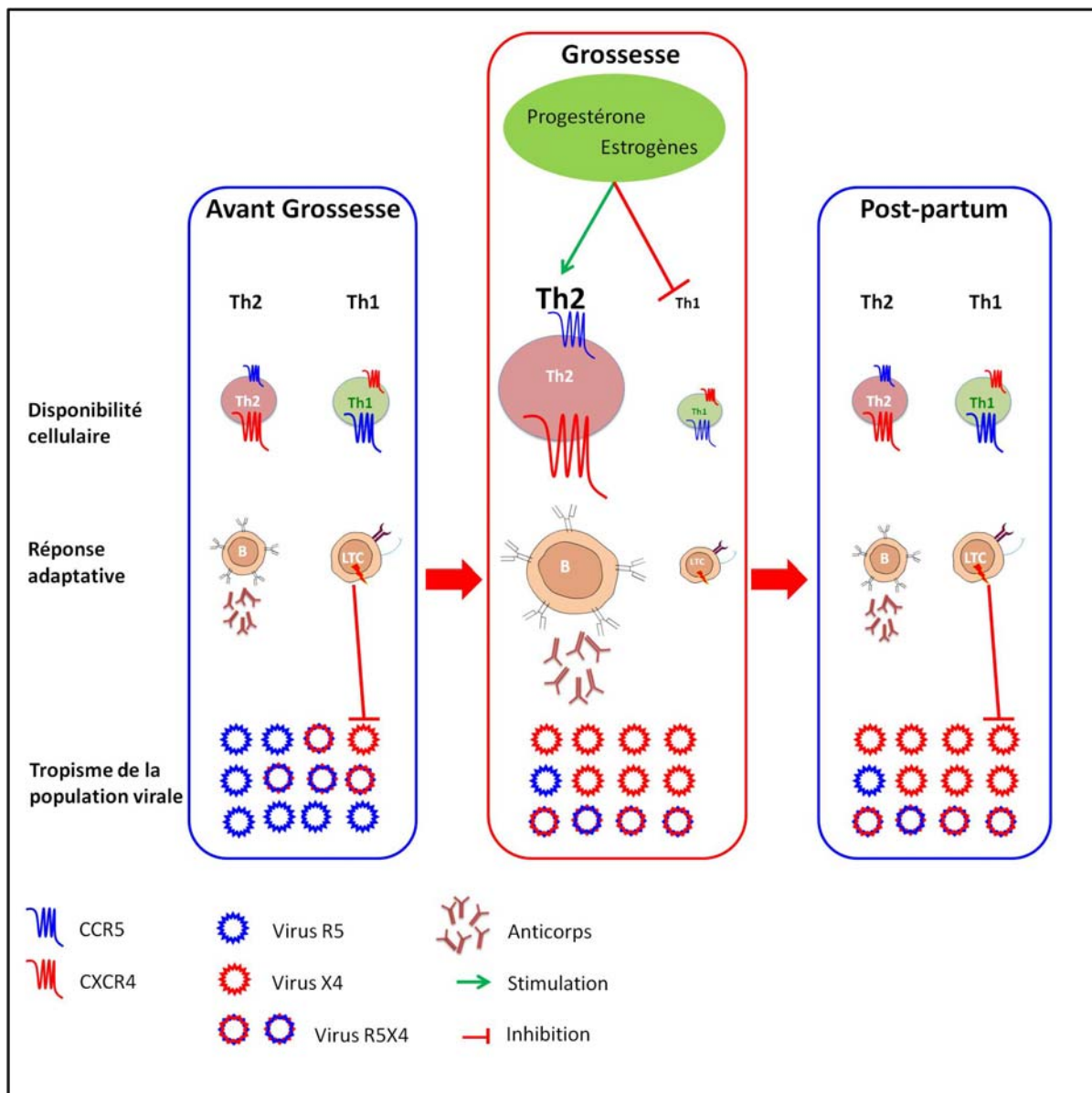
D'autre part, le switch de tropisme pourrait résulter de l'inhibition générale des réponses immunes à médiation cellulaire qui est associée à l'établissement et à la maintenance de la tolérance materno-fœtale (Brambell *et al.* 1954; Wegmann *et al.* 1993). En effet, il a été démontré que la déplétion des cellules T CD8<sup>+</sup> chez les singes rhésus infectés avec des virus VIH recombinants R5 et X4 menait à une émergence rapide de variants X4 au détriment des variants R5 (Harouse *et al.* 2003). Ces résultats suggéraient que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont responsables du contrôle de réplication des variants X4 et par conséquent, une diminution de cette réponse provoque un switch de tropisme (Figure 24). De plus, un traitement contraceptif



basé sur la progestine résulte en une réplication préférentielle des variants X4 (Trunova *et al.* 2006). La progestérone étant un immunomodulateur, abaissant notamment la réponse à médiation cellulaire (tel que discuté en introduction), le traitement à la progestine très probablement diminuerait les réponses CD8, et, de ce fait diminuerait le contrôle immunitaire face au virus X4, ce qui serait fortement compatible avec les résultats de Harouse *et al.* observés chez le singe (Harouse *et al.* 2003).

De façon intéressante, une déplétion des cellules B CD20<sup>+</sup> n'a pas mené à un switch de corécepteurs dans ce même système (Tasca *et al.* 2011).

Dans l'ensemble, les résultats de notre étude soutiennent un modèle cohérent selon lequel les déterminants du tropisme seraient activement influencés ou accélérés par les pressions sélectives exercées par les réponses immunes différentielles VIH-spécifiques associées à l'initiation et à la progression de la grossesse.



**Figure 24. Représentation schématique des possibles effets de la grossesse sur le tropisme du VIH-1.**

Chez les adultes non-enceintes, l'équilibre entre réponse Th1 et Th2 est normal, les cellules répondent aux stimuli selon le type de pathogène. Les lymphocytes Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub> expriment des niveaux différentiels des corécepteurs CXCR4 et CCR5 (Mariani *et al.* 2011; Sallusto *et al.* 1998a) représentés sur le schéma par la taille du corécepteur. La charge virale est contrôlée en phase chronique par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC) qui répriment efficacement la réplication des virus X4 selon Harouse *et al.* (Harouse *et al.* 2003). Lors de la grossesse, la progestérone et les œstrogènes stimulent la réponse Th<sub>2</sub> tout en inhibant la réponse Th<sub>1</sub> (Hel *et al.* 2010; Pazos *et al.* 2012; Straub 2007; Watanabe *et al.* 1997; Zen *et al.* 2010). Il en résulte,

d'une part, une plus grande disponibilité des cellules exprimant CXCR4 au détriment de cellules exprimant CCR5 et, d'autre part, une modification de la réponse adaptative. Premièrement, les réponses LTC sont diminuées et moins capables de contrôler la réplication virale et préférentiellement celle des virus X4 (Trunova *et al.* 2006). Deuxièmement, la stimulation de la production d'anticorps peut favoriser des mutations dans l'enveloppe (préférentiellement V1V2) propices à l'établissement de mutations dans V3 conférant le tropisme X4. Après la grossesse, les réponses Th1 et Th2 se rééquilibrent mais les virus X4 étant déjà établis, il est peu probable qu'une réversion du tropisme puisse s'opérer.

#### **1.4. Limites et perspectives de l'étude**

Certains aspects de la présente étude restreignent nos interprétations. Tout d'abord, nous étions limités au niveau de la taille des spécimens, ce qui ne nous a pas permis de faire une caractérisation longitudinale de la réponse humorale et cellulaire spécifique au VIH-1 chez les patientes. De plus, malgré les multiples échantillons obtenus en grossesse, des spécimens avant et après grossesse n'étaient pas disponibles. De ce fait, aucune analyse des effets potentiels de l'influence de l'initiation et de la terminaison de la grossesse sur le tropisme des corécepteurs n'a pu être réalisée. Une étude longitudinale en ce sens comprenant de nombreux échantillons avant grossesse et après grossesse sur une période minimale de 1 an avant et après la grossesse permettrait d'observer les changements de tropisme dans son ensemble. On pourrait ainsi déterminer s'il y a bien accélération du switch au cours de la grossesse et confirmer la non-réversion du switch.

#### **Cette étude ouvre la voie à d'autres études, mais d'autres questions restent en suspens.**

Le test phénotypique de Monogram® utilisé ici permet uniquement de déterminer si un échantillon est bi-tropique ou monotropique (R5 ou X4). Il ne permet malheureusement pas de confirmer l'augmentation relative de séquences X4 que les tests génotypiques prédisent. Tel que mentionné plus haut, l'utilisation de la technique du *single genome sequencing* suivie du Trofile® permettrait de palier à ces lacunes.

Une autre question très intéressante que soulève cette étude est le devenir à long terme des femmes et de la population VIH<sup>+</sup> en générale. Récemment, le groupe de Ronsmans a montré que les femmes enceintes infectées par le VIH-1 ont 8 fois plus de chance de mourir que leurs paires non-infectées (Calvert and Ronsmans 2013; Zaba *et al.* 2013). Bien que ces études

comparent des femmes porteuses et non-porteuses du virus, il est raisonnable de penser que la maladie est aggravée en grossesse au point de causer le décès de la patiente.

Si, tels que le suggèrent nos résultats, la grossesse accélère le switch chez des femmes présentant déjà une population virale bi-tropic, il serait pertinent d'évaluer épidémiologiquement la prévalence des souches R5X4 et X4 chez les femmes, et particulièrement chez celles ayant fait l'expérience d'au moins une grossesse.

Il faudrait également mener une étude comparative à grande échelle sur la prévalence du tropisme X4 et R5 chez les femmes ayant expérimenté la grossesse par rapport aux autres. Toutefois, une telle étude serait délicate à entreprendre étant donné les facteurs confondants tels que le fait que les femmes en meilleure santé sont plus susceptibles de supporter une grossesse. Ce phénomène appelé «*healthy pregnant women effect*» (Ronsmans *et al.* 2001) reflète le fait que les femmes en meilleure santé sont plus à même de devenir enceintes.

Deuxièmement, la fertilité diminue rapidement avec la durée de l'infection à VIH-1 (Lewis *et al.* 2004). Les femmes ayant eu des grossesses seraient possiblement plus âgées que les femmes n'ayant pas eu de grossesse, en plus du fait que les premières auraient tendance à avoir été infectées depuis plus longtemps que les dernières. Mis à part ces facteurs à contrôler, il serait très intéressant et très utile d'étudier cet aspect.

Finalement, une étude épidémiologique à grande échelle sur la prévalence du tropisme X4 chez les femmes par rapport aux hommes permettrait de déceler s'il y a effectivement un effet, une inégalité entre homme et femmes par rapport au tropisme, qui aurait comme mécanisme sous-jacent les hormones sexuelles.

## **2. Pression sélective exercée sur le gène de l'enveloppe au cours de la grossesse**

Au cours du premier chapitre, nous avons démontré que le tropisme du VIH-1 évoluait en grossesse de l'utilisation de CCR5 vers l'utilisation de CXCR4 et avons émis l'hypothèse que les changements immunitaires associés à la grossesse étaient responsables de cette

accélération du switch observé. Dans le second chapitre, nous avons donc étudié les effets de la réponse immunitaire sur l'évolution génétique du gène de l'enveloppe en analysant la pression sélective exercée en grossesse. Une des façons d'étudier la réponse du VIH-1 à la réponse immunitaire de l'hôte est d'étudier « l'empreinte » laissée par la réponse immunitaire sur les gènes viraux. Cette empreinte reflète la pression sélective exercée par la réponse immunitaire qui force le virus à évoluer pour y échapper.

Plus précisément, les questions que nous nous sommes posées sont les suivantes :

1. À quoi ressemble la pression sélective exercée sur le gène de l'enveloppe en grossesse?
2. Existe-t-il une réponse immunitaire différentielle à l'enveloppe entre femmes enceintes et non-enceintes qui pourrait confirmer les hypothèses émises au premier chapitre?
3. Comment évolue la pression sélective chez les femmes enceintes qui sont traitées au moyen de la thérapie antirétrovirale combinée?

## **2.1. Cartographie de la pression sélective exercée sur l'enveloppe du VIH-1 chez les femmes chroniquement infectées.**

La pression sélective exercée sur le gène de l'enveloppe en grossesse n'a à notre connaissance jamais été analysée auparavant. Notre premier objectif était donc de décrire cette pression au cours de la grossesse chez des femmes non-traitées en phase chronique de l'infection.

- **Profils de sélection similaires entre femmes enceintes et non-enceintes et cantonnés aux sites exposés de la gp120**

Le profil de la sélection, c'est à dire la cartographie de l'intensité de sélection selon les régions et sites de l'enveloppe, a été examiné en détail chez les femmes enceintes et non-enceintes.

En comparant la distribution de la sélection et des sites sélectionnés des régions variables V1-V3 et constantes C1-C3 de la gp120, nous avons observé des profils de sélection similaires chez les 2 groupes de sujets en phase chronique de l'infection, profils compatibles avec la prédominance d'une pression exercée par la réponse humorale. Ceci est à notre connaissance la première description du genre dans la littérature.

Premièrement, un examen de la hiérarchie de sélection a montré chez les 2 groupes un niveau global de sélection plus élevé dans les régions hypervariables V1, V2 et V3, ainsi que dans la région constante C3 comparativement à C1 et C2, qui montraient des niveaux de sélection comparables à ce qui a été rapporté pour les gènes plus conservés tels que *gag* et *pol* (Choisy *et al.* 2004). Ces observations ont été confirmées par l'analyse de sélection site-par-site.

Ainsi, nous avons pu déterminer que la pression sélective était principalement cantonnée aux régions exposées aux solvants, ce qui inclut les sites de glycosylation, les régions hypervariables V1, V2 et V3, mais également l'hélice  $\alpha$ -2 de C3. Nous avons identifié, après élimination des variations interindividuelles, 39 sites invariablement sélectionnés positivement (sites PS) dans les 2 groupes de patientes. Ces 39 sites PS étaient tous, sans exception, des sites exposés à la surface du trimère d'enveloppe et étaient de surcroît fortement associés aux sites potentiels de N-glycosylation. Ces résultats suggèrent fortement une implication disproportionnée de la réponse anticorps anti-gp120 dans la pression sélective appliquée sur l'enveloppe ainsi que l'association entre la sélection diversifiante dans *env* et la présence de PNGS (Choisy *et al.* 2004).

En effet, les sucres ajoutés à l'enveloppe par N-glycosylation jouent un rôle majeur dans l'échappement à la réponse humorale en empêchant des anticorps de reconnaître des épitopes critiques sur la gp120 (Choisy *et al.* 2004; Wei *et al.* 2003). Dans les stades les plus précoces de l'infection à VIH-1, la réponse humorale dirige l'évolution de la séquence de l'enveloppe et favorisent l'échappement immunitaire, principalement via le remodelage du manteau de glycans (Bar *et al.* 2012; Bunnik *et al.* 2008; van Gils *et al.* 2011a; Wei *et al.* 2003). L'élongation de V1V2 et l'addition de N-glycans dans les régions de polymorphisme de

longueur de V1V2 sont les contributeurs majeurs à l'évolution du manteau de glycan (Bunnik *et al.* 2008; Rong *et al.* 2007; van Gils *et al.* 2011a).

Cette contribution de V1V2 a pu être vérifiée chez nos patientes, en effet, V1V2 montraient les concentrations et fréquences de PS sites les plus élevées, principalement dans les régions de polymorphisme de longueur. Même si la grande majorité des études attribuent la pression sélective exercée par les anticorps au stades précoces de la maladie (Chaillon *et al.* 2012; van Gils *et al.* 2011a; Wei *et al.* 2003), les résultats présentés ici suggèrent que chez les patients infectés de façon chronique, la réponse humorale reste la principale force motrice de l'évolution de la séquence de l'enveloppe du VIH-1. Nos résultats sont également compatibles avec une étude récente de Chaillon *et al.*, qui ont montré que l'activité autologue neutralisante pouvait continuer à augmenter au cours du temps, même plus de 10 ans après l'infection (Chaillon *et al.* 2012).

Il faut toutefois savoir que l'échappement de la réponse humorale n'est pas que le fait des PNGS. En effet, une étude a révélé l'existence de pressions sélectives exercées sur le site d'attachement à CD4 par les AcN (Wu *et al.* 2012). De plus, la portion de C3 étudiée ici, qui représente les 17 acides aminés de l'hélice  $\alpha 2$ , a également été associée à de hauts niveaux de substitutions (Moore *et al.* 2008; Moore *et al.* 2009; Rong *et al.* 2009; van Gils *et al.* 2011b). Ces résultats appuient la notion que cette région de l'enveloppe est communément la cible d'AcN autologues (Gray *et al.* 2011; Moore *et al.* 2009). Les anticorps non-neutralisant jouent aussi un rôle dans la pression sélective exercée sur l'enveloppe via le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dirigée par les anticorps (ADCC) (Pollara *et al.* 2013; Veillette *et al.* 2014).

De manière intéressante, nous avons aussi observé que seulement 9% des sites PS étaient localisés dans les régions codant pour des épitopes CTL autologues chez les sujets pour lesquels un typage HLA a été effectué. Les épitopes CTL ne jouent pas un grand rôle dans l'évolution et le remodelage de l'enveloppe du virus. Ils sont largement surpassés par la pression exercée par les anticorps (Chaillon *et al.* 2012).

Les N-glycans peuvent également empêcher les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> d'accéder à des épitopes critiques sur la gp120, en interférant avec l'apprêtement correct des épitopes par encombrement stérique direct (Botarelli *et al.* 1991; Papandreou *et al.* 1996; Wei *et al.* 2003). Un exemple de ce type d'interférence est la région contenant 3 PNGS (N230, N234, N241) dans le domaine interne de l'enveloppe (C2), qui montrait des fréquences élevées de sélection positive. Ces résidus étaient situés juste en aval d'un épitope restreint par le HLA de classe II reconnu par les LTCD4<sup>+</sup> (Li *et al.* 2009). On pense que ces sites sont impliqués dans la formation d'une «tour de triple N-glycans» qui facilite l'échappement immunitaire sans altérer la séquence primaire de l'épitope CD4 (Li *et al.* 2009). Toutefois, cette tour formant une protrusion du domaine interne, ces PNGS pourraient très bien être également la cible d'AcN.

- **La sélection diffère à 4 positions**

Malgré le fait que les femmes enceintes et non-enceintes présentaient des profils de sélection similaires, un test hypergéométrique a mis en évidence 4 sites dont la fréquence de sélection différait significativement entre les 2 groupes. En effet, les positions L134, D137 et R308 étaient significativement associées à une sélection positive chez les femmes non-enceintes tandis que la position S347 était exclusivement sélectionnée chez les femmes enceintes (Figure 25). Les positions L134 et R308 étaient également associées spécifiquement à la sélection chez les femmes infectées par le VIH-1 de sous-type B. De ce fait, nous ne pouvons exclure que la surreprésentation du sous-type B dans le groupe 2 était la raison pour laquelle ces 2 positions ont été mises en évidence dans cette analyse. Néanmoins, des études antérieures ont indiqué que ces 4 résidus étaient impliqués dans l'induction de l'activité neutralisante (L134, S347) (Julien *et al.* 2013; van den Kerkhof *et al.* 2013; Walker *et al.* 2011) ou dans la reconnaissance du trimère d'enveloppe par des AcN monoclonaux (R308) (Mouquet *et al.* 2011) ou à large spectre (D137) (Julien *et al.* 2013; van den Kerkhof *et al.* 2013; Walker *et al.* 2011). De plus, l'acide aminé en position 308 dans la boucle V3 fait partie d'une grappe de covariation qui inclue les positions 11, 19 et 25 de V3; principaux déterminants du tropisme



(Korber *et al.* 1993; Milich *et al.* 1993). Une grappe de covariation indique généralement des acides aminés qui, pouvant ne pas être proches dans la structure primaire, peuvent être à proximité et en interaction dans la structure tridimensionnelle de la protéine, et de ce fait varient ensemble (Cashin *et al.* 2014; Dimonte *et al.* 2012). Il se pourrait donc que la mutation en position 308 soit associée à des mutations compensatrices dans le cas où les acides aminés associés au tropisme mutant et causent une diminution de la robustesse du virus via notamment une sensibilité accrue aux anticorps ou l'instabilité de l'enveloppe (Zhuang *et al.* 2012).

## **2.2. Existe-t-il une réponse immunitaire différentielle à l'enveloppe entre femmes enceintes et non-enceintes?**

Nous avons vu que les profils de sélection restaient, dans l'ensemble, inchangés entre les femmes enceintes et non-enceintes. Il pourrait toutefois exister des différences entre ces 2 groupes en termes de disponibilité cellulaire, et d'intensité/amplitude des pressions sélectives exercées par la réponse humorale ou la réponse à médiation cellulaire sur les régions soumises à cette pression.

- **Les variants du VIH-1 retrouvés chez la femme enceinte présentent une plus grande diversité génétique que ceux retrouvés chez la femme non-enceinte.**

La diversité génétique du VIH-1 est un indicateur direct de l'état immunitaire de l'hôte chez lequel le virus se développe. La diversité génétique, le taux de substitution et la pression sélective dans le gène de l'enveloppe sont autant de caractéristiques génétiques associées à la progression de la maladie (Ganeshan *et al.* 1997; Lemey *et al.* 2007; Ross and Rodrigo 2002a; Strunnikova *et al.* 1998; Strunnikova *et al.* 1995; Williamson 2003; Wolinsky *et al.* 1996). C'est pourquoi nous avons comparé ces différents composants de l'évolution génétique chez un groupe de femmes enceintes (Groupe 1) et de femmes non-enceintes (Groupe 2) en phase

chronique et qui n'ont pas reçu de traitement antirétroviral. La diversité nucléotidique ( $p$  distances) ainsi que les deux composantes de cette diversité; *i.e.* les taux de substitutions synonymes (dS) et non-synonymes (dN) ont donc été calculés, révélant dans les 3 cas des valeurs plus élevées chez la femme enceinte.

Des deux taux de substitution, dS était le contributeur majeur de la différence observée dans la diversité génétique entre femmes enceintes et non-enceintes. Le dS représente le taux de mutations neutres et est donc fonction de la vitesse de réplication de l'organisme en question. Des taux élevés de substitutions synonymes sont indicatifs d'une grande vitesse de réplication et d'un temps de génération court (Lemey *et al.* 2007; Shriner *et al.* 2004). Dans le cas du VIH-1, ces caractéristiques ont été associées à une progression rapide de la maladie ainsi qu'à l'activation immunitaire (Lemey *et al.* 2007). Alternativement, une dynamique de réplication élevée pourrait être le résultat d'un contrôle inefficace de la réplication virale dû à une immunodéficience progressive chez les sujets infectés. En effet, une plus grande diversité génétique du VIH-1 a été observée chez les patients aux stades tardifs de la maladie, incluant le stade SIDA (Hill *et al.* 2012).

Une élévation de l'expression de marqueurs d'activation cellulaire (*i.e.* fréquences des cellules  $CD4^+CD38^+HLA-DR^+$  and  $CD8^+CD38^+HLA-DR^+$ ) a été rapportée chez les femmes (non-enceintes) comparativement aux hommes infectés par le VIH-1 (Meier *et al.* 2009). Des observations similaires ont aussi été faites chez des femmes infectées ou non par le VIH-1 au cours de la grossesse par rapport à des femmes non-enceintes (Mikyas *et al.* 1997; Sachdeva *et al.* 2008). Meier *et al.* ont ainsi proposé que ces phénomènes pourraient expliquer le fait que la maladie progresse plus rapidement chez les femmes que chez les hommes et que le mécanisme sous-jacent pourrait être relié à une corrélation positive entre le taux de progestérone et la production d' IFN- $\alpha$  par les cellules dendritiques plasmacytoïdes suite à la stimulation via le récepteur TLR7/8, récepteurs reconnaissant les ARN simples brins viraux (Meier *et al.* 2009). Il est possible que la grossesse, qui se caractérise par des niveaux élevés de progestérone, potentialise ce phénomène, résultant en une amplification de la dynamique de réplication chez la femme enceinte (Bello *et al.* 2004; Maldarelli *et al.* 2013). Toutefois, nous n'avons trouvé aucune différence dans la charge virale entre les 2 groupes de sujets. Il faut toutefois rappeler

que nous n'avions les données de la charge que virale dans 61,2% des cas pour les sujets enceintes. Ceci est en accord avec des études qui ont montré que la diversité génétique n'était pas généralement associée à la charge virale (Bello *et al.* 2004; Maldarelli *et al.* 2013).

En somme, nos résultats suggèrent que les femmes enceintes présentent une plus grande dynamique de réplication du VIH-1. Ceci pourrait être dû à un contrôle inefficace de la réplication virale par la réponse à médiation cellulaire, à une activation immunitaire ou à une combinaison de ces deux phénomènes.

- **Amplitude de la sélection diminuée dans C2 chez la femme enceinte**

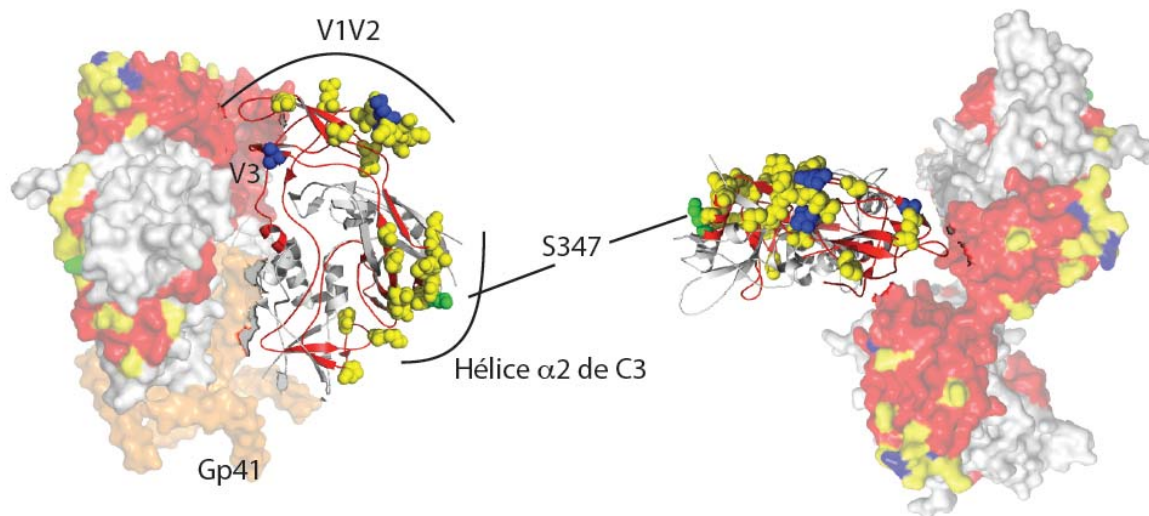
Les substitutions synonymes reflètent le taux de mutation et le temps de génération tandis que les substitutions non-synonymes (dN) sont principalement le résultat de la pression sélective.

Afin d'estimer la pression sélective, le ratio dN/dS (ou  $\omega$ ) a été calculé chez nos patientes. Les résultats ont montré que la pression globale calculée sur tous les sites du fragment de *env* étudié était inférieure à 1 ( $\omega < 1$ ). Cette valeur est compatible avec un certain degré de sélection purifiante, ce qui est en accord avec ce qui a été démontré dans la littérature chez les adultes non-enceintes ainsi que chez les enfants (Carvajal-Rodriguez *et al.* 2008; Chaillon *et al.* 2012; Choisy *et al.* 2004; Leal *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2010a).

En ce qui concerne les niveaux de sélection, c'est-à-dire l'amplitude de la pression sélective exercée sur l'enveloppe, des différences ont pu être observées entre les 2 groupes de sujets. En effet, même si la signification statistique n'était pas atteinte, une plus faible valeur de  $\omega$  dans C1-C3 a été observée chez la femme enceinte versus non-enceinte. De plus, la fréquence médiane de sélection par site était significativement plus faible dans le groupe 1 que dans le groupe 2. Cette tendance était conférée par la région C2, dans laquelle on a observé une valeur de  $\omega$  ainsi qu'une fréquence de sélection significativement plus faible chez la femme enceinte. Aucune différence n'a été notée dans les autres régions de l'enveloppe entre les 2 groupes de femmes. Intuitivement, cela suggère que la plus faible pression sélective dans C2 serait une conséquence des différences dans la réponse à médiation cellulaire plutôt qu'humorale entre

les 2 groupes. La région C2 est divisée en deux : la moitié C-terminale fait partie du domaine externe, tandis que la moitié N-terminale est enfouie dans le domaine interne de l'enveloppe.

Ces résultats suggèrent que la grossesse pourrait être associée à des changements subtils dans la pression sélective exercée sur la portion du gène de l'enveloppe étudiée ici.



**Figure 25. Représentation tridimensionnelle de l'enveloppe du VIH-1 et des différences dans la pression sélective entre les femmes enceintes et non-enceintes.**

Les sites PS communs aux 2 groupes sont représentés par des sphères jaunes. Les sphères bleues représentent les sites PS associés au groupe de femmes non-enceintes. Les sphères vertes représentent les sites PS associés au groupe de femmes enceintes. En rouge, la portion de la gp120 que nous avons étudié. En orange, la gp41. Les positions d'acides aminés correspondent à ceux de la séquence de référence du VIH-1 HXB2. La cartographie a été réalisée sur la structure 3D de la gp120 (ID: PDB3J5M) (Lyumkis *et al.* 2013).

### **2.3. Diminution de la pression sélective dans l'enveloppe au cours de la grossesse chez les patientes traitées avec des agents antirétroviraux**

Dans la 2<sup>ème</sup> partie de l'étude, nous avons examiné l'évolution de la pression sélective chez nos patientes traitées qui ont été suivies prospectivement au cours de leur grossesse. Chez ces patientes, la charge virale a diminué de façon significative au cours de la grossesse suite à l'introduction et/ou de l'intensification de la thérapie antirétrovirale. Par conséquent, les valeurs des 3 paramètres de diversité (p-distance, dN et dS) diminuaient également chez ces sujets, sans toutefois atteindre le seuil de la signification statistique. Cependant, cette diminution progressive ramenait les valeurs de la diversité des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres au même niveau que ce qui était observé chez les femmes non-enceintes. Cela suggère que le traitement antirétroviral ramène la dynamique de réplication chez ces femmes enceintes à des niveaux comparables à ce qui est vu hors grossesse en diminuant la charge virale (Tai *et al.* 2007).

Le ratio  $\omega$  est resté stable durant la grossesse lorsque calculé sur le fragment entier et sur les différentes sous-régions de l'enveloppe, mis à part dans V1, où une diminution significative a été observée. Enfin, une diminution significative du nombre de sites PS a également été observée avec la progression de la grossesse, *i.e* entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> trimestre. Il est possible que la réduction du nombre de sites PS soit une conséquence du traitement ARV menant à une diminution de la charge virale et à un déclin de la diversité génétique du VIH-1.

D'un autre côté, le fait que la sélection diminuée soit reliée à la progression de la grossesse ne peut être exclu. Les niveaux de progestérone et d'œstrogène atteignent un pic au 3<sup>ème</sup> trimestre (Doria *et al.* 2006b; Johansson 1969; Levitz and Young 1977). Les effets immunosuppresseurs de niveaux élevés de ces hormones sur les réponses à médiation cellulaire sont bien documentés (Canellada *et al.* 2002; Hel *et al.* 2010; Straub 2007; Zen *et al.* 2010), contribuant possiblement au biais Th2 systémique observé chez la femme enceinte (Bisset *et al.* 1990; Wilson *et al.* 2001). V1 étant la cible première de la réponse humorale spécifique au VIH-1

(Bunnik *et al.* 2008; Rong *et al.* 2007), un déclin de la pression de sélection serait compatible avec des changements longitudinaux dans les profils d'Ig au cours de la gestation. En effet, la grossesse normale s'accompagne d'augmentation dans la synthèse d'Ig particulièrement d'IgG (Bisset *et al.* 1990; Wilson *et al.* 2001). Toutefois, ces niveaux déclinent progressivement avec l'avancée de la grossesse dû en partie au transfert transplacentaire des 4 isotypes d'IgG (IgG1>IgG4>IgG3>IgG2) qui s'accélère avec vers la fin de la gestation (Brambell *et al.* 1954; Simister 2003). Tel qu'observé chez la souris (Aluvihare *et al.* 2004), il est également possible que l'activité des cellules T régulatrices associée à la tolérance maternofoetale contribue à l'atténuation des réponses immunitaires à médiation cellulaire de la mère, résultant en un déclin général du nombre de sites PS observé ici.

## **2.4. Limites et perspectives de l'étude**

Les limites de l'étude 2 incluent le fait que seules des séquences partielles du génome du VIH-1 ont été utilisées dans cette analyse. Des études incluant des séquences du génome entier et/ou des amplifications pleine longueur permettraient une caractérisation plus en profondeur des pressions sélectives exercées sur d'autres gènes du VIH-1 tels que les produits de la protéine de capsid p24 et la transcriptase inverse p66/51.

De plus, la disponibilité des échantillons avant-grossesse aurait pu permettre l'analyse de l'influence de l'initiation de la grossesse sur la pression sélective, étude que nous n'avons pas pu réaliser dans le contexte de notre étude. Les sujets étudiés ici sont infectés par des virus de clades différents. Alors que cette diversité permet de décrire le comportement du virus chez plusieurs sous-types, le nombre total de sujets ne permettait pas de stratifier les patientes par clade de souches infectantes. De ce fait, la surreprésentation du sous-type B dans le groupe des femmes non-enceintes amène un biais de clade dans l'identification des sites PS associés à la grossesse. Bien que nous ayons contrôlé pour l'influence du sous-type dans notre étude, on ne peut pas exclure ce biais. La façon d'y remédier serait là encore une étude à plus grande échelle comprenant plus de sujets. Malheureusement, les groupes de séquences présents dans les banques de données répondant à nos critères de sélection ne permettaient pas d'élargir notre groupe.

## 2.5. Que veulent dire nos résultats en terme d'évolution du tropisme?

Les différences observées dans la pression sélective chez ces femmes enceintes et non-enceintes sont subtiles dans la région de l'enveloppe étudiée ici et ne sont pas directement situées dans des régions ou positions associées à l'évolution du tropisme du VIH-1. En effet, aucun des 39 sites PS n'a été identifié dans les régions déterminant le tropisme, tels que les positions 11, 24 et 25 de la boucle V3, ni dans la couronne de V3, ni dans la lame pontante ou encore dans en position 262 récemment identifiée dans C2 (Lombardi *et al.* 2015) . Cela implique que la grossesse n'exerce pas de pression sélective directement sur les régions de l'enveloppe virale qui spécifient le tropisme du VIH-1, et qu'il n'y a pas de réponse humorale préférentiellement dirigée vers des épitopes des régions gouvernant le tropisme. De plus, si l'hypothèse de la disponibilité cellulaire s'applique (discutée en introduction), il ne s'agit pas de changements drastiques. Cette dernière hypothèse n'est pas incompatible avec nos résultats, étant donné que s'il y avait en grossesse un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire vers une légère surreprésentation des cellules CXCR4<sup>+</sup>, nous n'observerions pas de pression sélective sur les déterminants du tropisme. L'hypothèse d'un moins bon contrôle viral par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ne peut pas non plus être rejetée. En effet, la plus grande diversité génétique (dS mais aussi dN) observée, de même que la plus faible intensité de pression sélective dans C2 vont toutes deux dans ce sens. Un moins bon contrôle viral par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pourrait expliquer pourquoi les virus X4 prennent le dessus sur les virus R5 dans le cadre de la grossesse. De plus, une étude Mild a montré une très forte association entre le taux de substitution élevé et le switch du tropisme (Mild *et al.* 2013). Le fait d'avoir une plus faible pression sélective sur C2 et la dynamique de réplication plus élevée suggère que la réponse à médiation cellulaire est moins efficace chez la femme enceinte que chez la femme non-enceinte. Toutefois, pour confirmer cette hypothèse, des études sur les autres gènes du VIH-1 seront nécessaires; analyse que nous n'avons pas pu faire ici car des ensembles de séquences intrapatiens chez les femmes enceintes et non-enceintes répondant à nos critères d'inclusion n'étaient pas disponibles dans les bases de données du Laboratoire

national de Los Alamos. En effet, c'est le gène de l'enveloppe qui est le plus couramment étudié en ce qui concerne l'étude des quasi-espèces du VIH-1, contrairement aux autres gènes du virus.

### **3. Limites et perspectives inhérentes aux 2 études évolutives**

Les 2 études évolutives présentées aux chapitres 1 et 2, *i.e.* évolution de l'utilisation des corécepteurs et évolution de la pression sélective en grossesse, ont été faites sur des échantillons de femmes enceintes dont le traitement était initié et/ou intensifié (c.-à-d. addition d'antirétroviraux) au cours de la grossesse dans la majorité des cas.

Les conclusions issues de ces études ne nous permettaient donc pas de dissocier la progression de la grossesse de l'effet du traitement antirétroviral. Bien que des études aient montré que l'évolution du tropisme et le traitement étaient dissociés, dans le cas de la pression sélective, la diminution de la diversité génétique peut être due autant au traitement ARV qu'à la progression de la grossesse. Nos résultats ne nous permettent pas de tirer des conclusions sur cet aspect.

Deuxièmement, vu le manque d'échantillons appropriés, il nous était donc impossible de déterminer quels étaient les effets de l'initiation et de la terminaison de la grossesse sur l'évolution du tropisme et sur l'évolution de la pression sélective.

Afin de palier à ces limites, il conviendrait de concevoir une étude avec des échantillons prospectifs de femmes en désir de grossesse dont le traitement reste quasiment homogène sur la durée de l'étude. Nous avons accès ici au CMIS à une cohorte de femmes en désir de grossesse dont les échantillons sont prélevés régulièrement avant, pendant, et après la grossesse. Il conviendrait alors sur ce groupe de femmes, d'évaluer l'évolution du virus sur une période allant de 1 an avant et après grossesse. Il ne s'agit pas là du groupe parfait, car ces patientes reçoivent un traitement suppressif (c.-à-d. dans le but d'arriver à une charge virale



indélectable), ce qui voudrait dire que les virus analysés seraient les provirus et non le virus plasmatique. Cette étude, d'une part en éliminant le facteur évolution du traitement et d'autre part incluant des échantillons avant et après grossesse, nous permettrait d'avoir une vision plus claire des effets réels de l'initiation, de la progression et de la terminaison de la grossesse sur l'évolution du virus.

Il sera également intéressant d'évaluer concrètement la réponse immunitaire VIH-spécifique des femmes enceintes. Une étude a été réalisée au laboratoire précédemment sur la réponse des cellules T spécifique au VIH-1 chez les femmes de la cohorte du CMIS, et également sur les femmes de l'étude désir de grossesse (Jolette *et al.* 2015). Cette étude a montré globalement que la réponse IFN- $\gamma$  des lymphocytes CD8<sup>+</sup> aux antigènes de Gag n'était pas différente avant et pendant grossesse. En tant qu'avenue de recherche, je proposerais d'analyser les réponses cellulaires aux antigènes de Gag mais également à d'autres antigènes tels que Pol et Env. Il faudrait également investiguer non seulement la réponse à médiation cellulaire des patientes en examinant la réponse INF- $\gamma$  mais également d'autres cytokines telles que IL-10, IL-13, IL-22, associées au contrôle de l'infection à VIH-1, mais il faudrait également investiguer la réponse humorale. Cette étude porterait d'une part sur l'évolution de la neutralisation des virus autologues par les anticorps de la patiente, ainsi que sur le mécanisme d'ADCC, qui joue un rôle important dans le contrôle de l'infection et le modelage de la quasi-espèce (Kramski *et al.* 2015; Lambotte *et al.* 2009).

## **4. Évolution adaptative du tropisme du VIH-1 à l'échelle de la population**

Les observations issues du premier chapitre nous ont mené à nous poser la question de l'évolution du tropisme à l'échelle de la population.

Au cours de l'histoire naturelle de l'infection à VIH-1, les gènes viraux évoluent principalement sous la pression sélective exercée par la réponse immunitaire du patient.

Les régions hypervariables V1, V2 et V3 du gène de l'enveloppe évoluent au cours de l'infection et ces 3 régions ont été associées aux déterminants du tropisme (Boyd *et al.* 1993; Fouchier *et al.* 1995; Groenink *et al.* 1993; Hoffman *et al.* 2002; Jansson *et al.* 2001; Jensen *et al.* 2003; Labrosse *et al.* 2001; Ogert *et al.* 2001; Pastore *et al.* 2006; Thielen *et al.* 2010).

Dans le présent chapitre, à travers l'analyse des déterminants du tropisme dans les virus utilisant CCR5, nous avons montré qu'une évolution adaptative du tropisme a eu lieu au cours de l'épidémie chez différents sous-types.

#### **4.1. Augmentation du score PSSM dans les séquences contemporaines**

Les séquences X4 sont définies par un score PSSM ainsi qu'une charge nette de V3 élevés. Ainsi, ces 2 paramètres sont utilisés dans les algorithmes de prédiction du tropisme du VIH-1 pour les différents sous-types du virus. Ici, comme dans le chapitre 1, nous avons analysé l'évolution de ces paramètres dans des séquences de virus R5, cette-fois ci issues des bases de données du Laboratoire national de Los Alamos (hiv.lanl.gov). Nous avons analysé les scores PSSM dans les séquences contemporaines versus les séquences plus anciennes de V3 de virus R5 et avons trouvé que les premières étaient caractérisées par des scores PSSM plus élevés que les anciennes chez les sous-types C et D. Chez le sous-type B, nous avons observé une augmentation du score PSSM avec l'âge de l'épidémie mais pas d'augmentation significative de la charge de V3. Contrairement à ce qui est observé chez un individu infecté, chez qui l'évolution du tropisme s'accompagne invariablement d'une augmentation de la charge nette de V3 (Jensen *et al.* 2003; Mild *et al.* 2010), ici une évolution du score PSSM au cours de l'épidémie n'était pas associée à une augmentation de la charge nette de V3. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la charge nette de V3 est le prédicteur le plus fort de la préférence du tropisme (Jensen *et al.* 2003; Raymond *et al.* 2008). Une charge élevée de V3 favorise très grandement l'utilisation de CXCR4, tandis que les positions analysées dans le score PSSM peuvent muter sans pour autant amener directement le switch du tropisme, étant donné qu'une combinaison de mutations est nécessaire pour induire le switch. Ainsi, ici, la population virale

analysée est composée uniquement de virus R5, virus qui peuvent arborer des mutations associées au tropisme X4.

Nous suggérons donc que l'évolution des déterminants du tropisme dans ces isolats était la conséquence des événements de transmission. En effet, Edo-Matas *et al.* ont suggéré, à partir d'une étude faite sur une paire donneur-receveur, que les caractéristiques associées au stade avancé de la maladie qu'arborait le virus du donneur, tels qu'un score PSSM élevé et une charge V3 élevée, étaient transmises au receveur (Edo-Matas *et al.* 2012). De façon intéressante, dans cette paire de transmission, des virus X4 se sont développés chez le donneur mais pas chez le receveur pendant la durée de l'étude. Ce qui est facilement concevable car le chemin mutationnel qu'emprunte le virus est fortement dépendant du terrain immunitaire sur lequel il se développe; *i.e.* la réponse immunitaire de l'hôte.

#### **4.2. L'allongement de V1V2 et l'augmentation du nombre de PNGS sont associés à l'augmentation du score PSSM dans les séquences contemporaines**

Nous avons analysé les déterminants du tropisme dans les régions V1 et V2. La longueur de V1V2 ainsi que le nombre de PNGS dans ces régions ont été examinés dans les virus R5 et X4. Nous avons trouvé que les séquences X4 étaient caractérisées par de plus longues V1V2 que les virus R5, et ceci dans les 3 sous-types analysés (B, C et D). D'autre part, les virus X4 de sous-type B étaient caractérisés par moins de PNGS dans V1V2, alors qu'une tendance en ce sens était observée chez le sous-type C, et que pour le sous-type D, l'inverse était observé. Une longue région V1V2 et un grand nombre de PNGS ont été associés à des virus X4 principalement dans le sous-type C mais pas uniquement (Coetzer *et al.* 2011; Dash *et al.* 2008; Fouchier *et al.* 1995; Ransy *et al.* 2014). Ces caractéristiques peuvent être reliées aux stades tardifs de la maladie. En effet, chez un individu, une élongation drastique de V1V2 de façon concomitante avec l'addition de PNGS est observée durant la première année d'infection, tandis que dans les stades plus tardifs (*i.e.* 6 ans post-séroconversion), le ralentissement de la réponse humorale est accompagné par la diminution de longueur de V1V2

et la perte de PNGS dans les stades tardifs et terminaux de l'infection (Borggren *et al.* 2011; Bunnik *et al.* 2008). Toutefois, malgré cette inversion, dans la majorité des cas, les séquences des virus des stades très tardifs ne recouvrent pas leur longueur et nombre de PNGS initiaux (Bunnik *et al.* 2008). Une glycosylation abondante contribue à l'efficacité de l'infection virale mais est également efficace pour échapper à la surveillance immunitaire (Bunnik *et al.* 2008; Sagar *et al.* 2006). En plus des contraintes conformationnelles, il a été proposé que la région V3 des variants X4 étaient plus sensible à la neutralisation par les anticorps que la V3 des variant R5 (Bunnik *et al.* 2007). Ainsi, l'allongement de V1V2 mais aussi l'addition de PNGS, pourrait servir à protéger V3 et à augmenter la virulence (*fitness*) du virus (Losman *et al.* 2001; Pinter *et al.* 2004).

De même, les séquences contemporaines de virus R5 arboraient une plus longue V1V2 et plus de PNGS comparativement aux séquences R5 plus anciennes. Ces résultats sont en accords avec l'étude de Bunnik *et al.*, qui ont démontré l'élongation de V1V2 et l'addition de PNGS dans cette région avec le vieillissement de l'épidémie, ce qui résultait en une résistance accrue aux AcN des virus contemporains (Bunnik *et al.* 2010a). De façon intéressante, nous avons trouvé une corrélation positive entre la longueur de V1 et le score PSSM chez les virus R5, tandis qu'aucune association de la sorte n'a pu être faite entre le nombre de PNGS et le score PSSM. Ce qui est intrigant étant donné que l'allongement des boucles hypervariables, et principalement V1, est fortement associée à l'addition de groupes N-glycans.

Nous émettons donc l'hypothèse que l'évolution concomitante du tropisme des corécepteurs et de la longueur de V1V2 pourrait être 2 phénomènes interdépendants. C'est ce que nous avons observé chez 3 de nos patientes en évolution de tropisme de R5 vers X4 (TV1151, clade A; TV715 et TV1261, clade C): ces 3 sujets ont montré une élongation de V1V2 en concomitance avec l'évolution des déterminants du tropisme vers une utilisation de CXCR4. L'élongation de V1 pourrait jouer le rôle de bouclier pour la séquence V3 des virus R5 contre la réponse humorale. Ceci pourrait permettre aux séquences R5 contemporaines de développer des mutations pouvant conférer le tropisme X4 et ce, à l'abri de la réponse humorale, les virus X4 étant considérés comme plus sensibles à la réponse humorale (Bunnik *et al.* 2007; Zhuang *et al.* 2012). Bunnik *et al.* ont observé les plus grands changements dans la boucle V1, qui est

la cible primordiale des anticorps autologues neutralisants et qui protège les épitopes sous-jacents vulnérables à la reconnaissance par ces anticorps (Bunnik *et al.* 2008). Similairement, dans la présente étude, nous avons observé que la longueur de V1 était le seul paramètre fortement associé au score PSSM dans tous les sous-types étudiés. Ceci suggère qu'il y a une association entre l'émergence de variants X4 et l'élongation de la boucle V1 au cours de la maladie. Une longue boucle V1 pourrait protéger V3 contre les AcN, permettant ainsi à V3 d'accumuler des mutations propices au tropisme X4. En effet, la nouvelle structure cristalline de l'enveloppe montre que la boucle V3 est située sous V1V2 et est protégée par cette dernière (Julien *et al.* 2013; Lyumkis *et al.* 2013). V1V2 forme ainsi un bouclier protégeant la boucle V3 qui est située juste en dessous dans la conformation tertiaire non-liée de la protéine.

### **4.3. Augmentation de l'index de vraisemblance de V2 dans les séquences contemporaines et corrélation avec l'augmentation de la longueur de V1V2**

Le dernier déterminant du tropisme que nous avons analysé était la séquence primaire de V2. L'index de vraisemblance de V2 a été introduit au chapitre 1 (Ransy *et al.* 2014) et a été utilisé afin d'analyser l'évolution des substitutions d'acides aminés dans les séquences de V2. De façon similaire au score PSSM, l'index de V2 reflète l'abondance relative de mutations X4 dans une séquence V2 donnée. Les calculs basés sur des grappes de données montrent que l'indice de V2 est plus élevé dans les variants X4 que les variants R5. Après comparaison des séquences contemporaines et anciennes, nous avons observé de plus hauts indices de V2 dans les séquences contemporaines, et ce pour les 3 sous-types étudiés (B,C et D). Par conséquent, ces résultats indiquent que des substitutions d'acides aminés comparables avec une évolution vers le tropisme X4 pouvaient être observées dans les séquences de V2 provenant de virus R5 au cours de l'épidémie. Toutefois, les mutations dans V2 pourraient également représenter un gain de robustesse afin de compenser la perte induite par les substitutions dans V3 responsables du switch, tel que discuté par Pastore *et al.* (2006).

En conclusion, nos résultats montrent une accumulation de mutations associées au tropisme X4 dans les virus R5 durant l'épidémie, indiquant une adaptation à l'échelle de la population des divers sous-types du VIH-1.

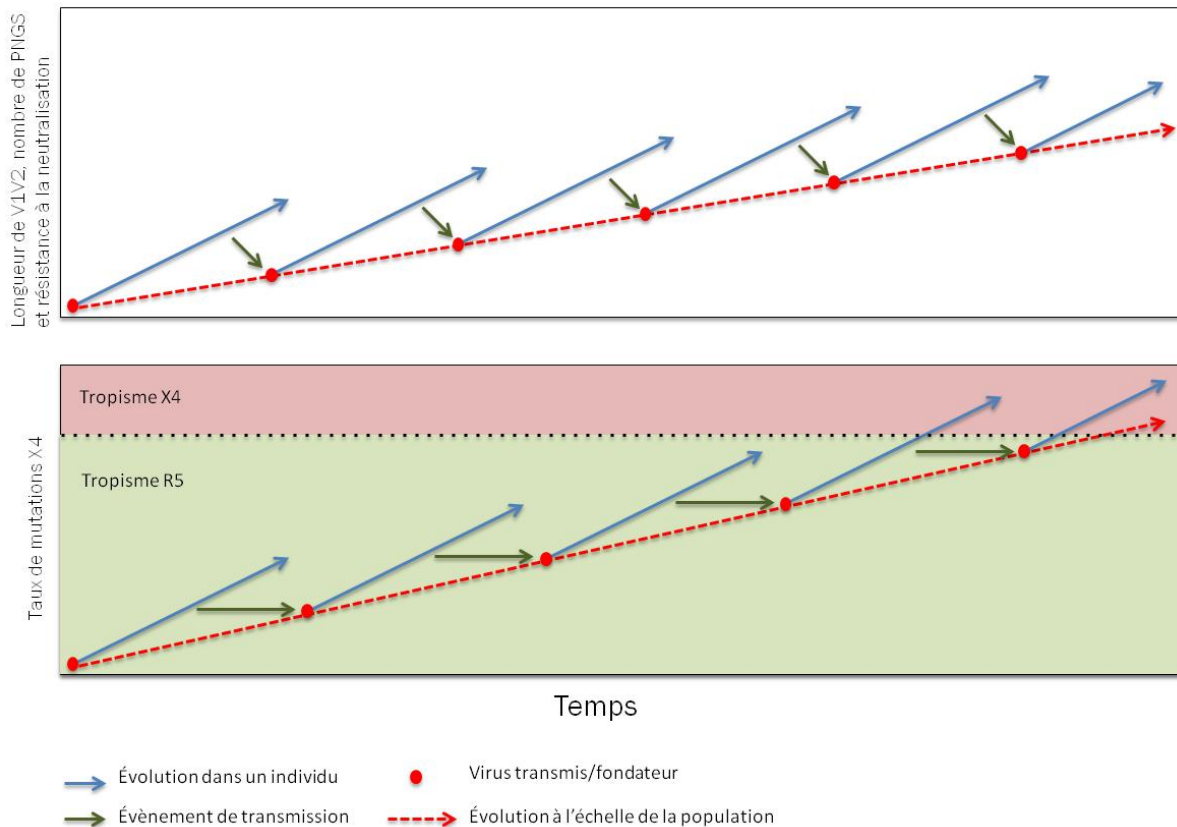
#### **4.4. Limites**

Les limites principales de cette étude sont le manque de séquences disponibles dans les bases de données qui rencontraient nos critères d'inclusion: a) isolats R5 ; b) longueur du segment de l'enveloppe étudié (V1-V3) ; et c) stade précoce/aigu de l'infection. Par conséquent, seules des séquences du sous-type B sont issues d'échantillons collectés durant les 4,5 premiers mois post-séroconversion (Bunnik *et al.* 2010a). En ce qui concerne les sous-types C et D, le stade de l'infection n'était pas connu. De plus, les séquences anciennes (avant 1990) n'étaient pas disponibles pour ces sous-types, contrairement au sous-type B, ce qui ne nous a pas permis de faire une stratification standard des séquences qui auraient pu être appliquée à toutes les données. Toutefois, les mêmes résultats ont été retrouvés chez les 3 sous-types en ce qui a trait l'évolution du tropisme envers le corécepteur au cours de l'épidémie.

#### **4.5. Implications**

Tandis que cette étude appelle de plus amples investigations, l'adaptation possible du tropisme du VIH-1 à l'échelle de la population pourrait expliquer de nombreuses observations rapportées durant l'épidémie de VIH-SIDA. En effet, une augmentation de la prévalence des virus DM/X4 collectés aux stades tardifs de l'infection a été observée chez les individus infectés par les sous-types C (Connell *et al.* 2008; Gupta *et al.* 2013), A et CRF02\_AG (Esbjornsson *et al.* 2010). De même, une récente étude espagnole a rapporté l'augmentation de prévalence de virus X4 chez des individus récemment infectés par le virus de sous-type B (Sierra-Enguita *et al.* 2014). Ces observations indiquent une épidémie en pleine évolution. De fait, nous pouvons facilement comprendre que chez un sujet infecté par une souche R5 contemporaine, le chemin mutationnel pour atteindre le switch de tropisme est plus court que ce qui pourrait être observé chez un individu infecté par une souche plus ancienne de VIH-1. Ceci menant par conséquent à une augmentation de l'occurrence de switch dans la population

dans le contexte d'une épidémie vieillissante. Dans le même ordre d'idées, Schuitemaker *et al.* ont proposé un modèle hypothétique de l'évolution de l'utilisation de CXCR4 en relation avec l'âge de l'épidémie d'un sous-type particulier (Schuitemaker *et al.* 2011). Dans ce modèle, l'épidémie du sous-type D, ayant la plus forte prévalence de switch, serait la plus ancienne épidémie, tandis que celle impliquant le sous-type C, qui a une prévalence de switch beaucoup plus faible, serait une des plus récentes (Gray *et al.* 2009; Worobey *et al.* 2008). L'épidémie de sous-type B possède quant à elle un profil intermédiaire tant en termes d'âge de l'épidémie que de prévalence de virus X4 (Gilbert *et al.* 2007; Schuitemaker *et al.* 2011). L'augmentation de l'émergence de virus X4 aux stades plus tardifs de la maladie de façon concomitante à une augmentation de la résistance à la neutralisation observée chez les virus contemporains au niveau de la population pourrait avoir une importance particulière dans le cadre du déploiement de traitements antirétroviraux basés sur des antagonistes de CCR5, mais aussi dans le cadre du développement de vaccins (Figure 26).



**Figure 26. Schéma de l'évolution de la longueur de V1V2, du nombre de PNGS dans V1V2 et du tropisme du VIH-1 à l'échelle de la population et au cours de l'épidémie.**

L'évolution du VIH-1 est représenté en fonction du temps : évolution de la longueur de V1V2 et de la résistance à la neutralisation (panel du haut) ainsi que le taux de mutation X4 (panel du bas) dans les séquences sont représentés par la fleche discontinue rouge. L'évolution du virus chez un individu est représentée par la fleche bleue. Les événements de transmission sont représentés par les fleches vertes. Le seuil de mutation X4 nécessaire à l'acquisition du tropisme X4 est représenté par la ligne discontinue noire (panel du bas). (Panel du haut Inspiré de la présentation de Dr. Schuitemaker, Croi 2010).

## 4.6. Perspectives

Cette étude étant uniquement préliminaire, il serait intéressant dans l'avenir d'établir une étude basée sur un plus grand nombre d'individus en primo-infection. Le séquençage des régions V1 à V3, mais également d'autres régions de l'enveloppe virale, permettrait d'évaluer



l'évolution du tropisme chez les virus R5 au sein de la population en intégrant de nouvelles données issues des autres régions pouvant influencer le tropisme du virus.

Une telle étude nécessiterait d'avoir à disposition une banque d'échantillons rétrospectifs, allant jusque dans les années 80 au mieux, d'individus en primo-infection.

Malheureusement les échantillons présents dans notre cohorte ici au CHU Sainte-Justine ne permettraient pas de mener une telle étude, le moment d'infection étant inconnu pour la vaste majorité de nos patientes. Ceci dit, une fois le bon groupe de sujets établis, non seulement l'évaluation de la séquence de l'enveloppe pourrait être analysée, mais l'évolution de l'utilisation des corécepteurs pourrait également être investiguée. En effet, il serait intéressant de confirmer que cette augmentation du taux de mutations liées à X4 observée chez les virus R5 au cours de l'épidémie s'accompagne d'un switch plus rapide, mais aussi plus fréquent, chez les individus infectés par des souches contemporaines par rapports aux individus porteurs de souches anciennes.

Une deuxième question se posait lors de cette étude, il s'agit de la question de l'augmentation de la résistance à la neutralisation par les anticorps. Cette observation a été réalisée par le groupe de Schuitemaker (Schuitemaker *et al.* 2011). Les virus contemporains étaient plus résistants à la séroneutralisation que les virus anciens. Ceci poserait un problème notamment pour l'élaboration de vaccins, non seulement les virus contemporains seraient plus résistants à la neutralisation, mais ils seraient également plus virulents de par le plus grand potentiel de switch de tropisme. Ce sont des avenues à explorer et à surveiller dans des recherches futures ainsi que dans le contexte du développement et du déploiement de la thérapie et de la prophylaxie antirétrovirale.

## **5. Grossesse et tropisme**

Au cours du premier chapitre nous avons démontré que le tropisme du VIH-1 évoluait au cours de la grossesse. Nous avons pu observer un switch de tropisme des virus des patientes de R5 vers X4. Cette évolution pourrait bien être potentialisée par la progression de la grossesse, conséquence de la modulation de la réponse immunitaire maternelle. Nous avons également

observé des différences subtiles dans la pression sélective exercée sur les séquences de sujets enceintes par rapport à des sujets non-enceintes. Nous pouvons établir un schéma intégratif de ce qui se passe en grossesse au niveau de la séquence du virus et qui peut mener à une évolution du tropisme chez la femme enceinte (Figure 27).

L'évolution génétique du VIH-1 chez un individu est un processus complexe qui dépend de multiples facteurs, ce qui explique le fait qu'après 30 ans d'épidémie, nous n'avons toujours pas déchiffré ce mécanisme. L'hypothèse que nous avons avancée à la lumière de nos résultats stipule que les changements immunitaires associés à la grossesse peuvent suffire à faire évoluer le tropisme de R5 vers X4 lorsque ce processus est déjà amorcé. Mais la grossesse en elle-même n'est pas suffisante pour provoquer un switch dans une population virale strictement R5 vers un tropisme X4. Cela est en accord avec les résultats que nous avons obtenu. En effet, les différences dans la pression sélective étaient subtiles entre femmes enceintes et non-enceintes et n'étaient pas cantonnées aux acides aminés déterminant le tropisme viral.

Selon le modèle d'évolution du tropisme de Zuhang, le point central de l'évolution du tropisme est l'adoption d'une conformation ouverte de l'enveloppe (Zhuang *et al.* 2012). Cette conformation ouverte permettrait une meilleure utilisation de CD4 (Figure 27). L'équipe de Dürr a confirmé en 2014 la conformation ouverte de la gp120 des virus X4 par rapport aux virus R5 en caractérisant la structure cristalline de la souche NL4-3 (Arnold *et al.* 2014). La figure 27 explique le chemin menant au switch et intègre les différentes étapes potentiellement influencées par la grossesse.

Les évènements génétiques et physiologiques menant au switch du tropisme du VIH-1 sont multiples et inter-dépendants. Nous avons pu, à la lumière de nos résultats, proposer un schéma intégratif de l'évolution du tropisme et de l'influence potentielle de la grossesse sur ce processus (Figure 27).

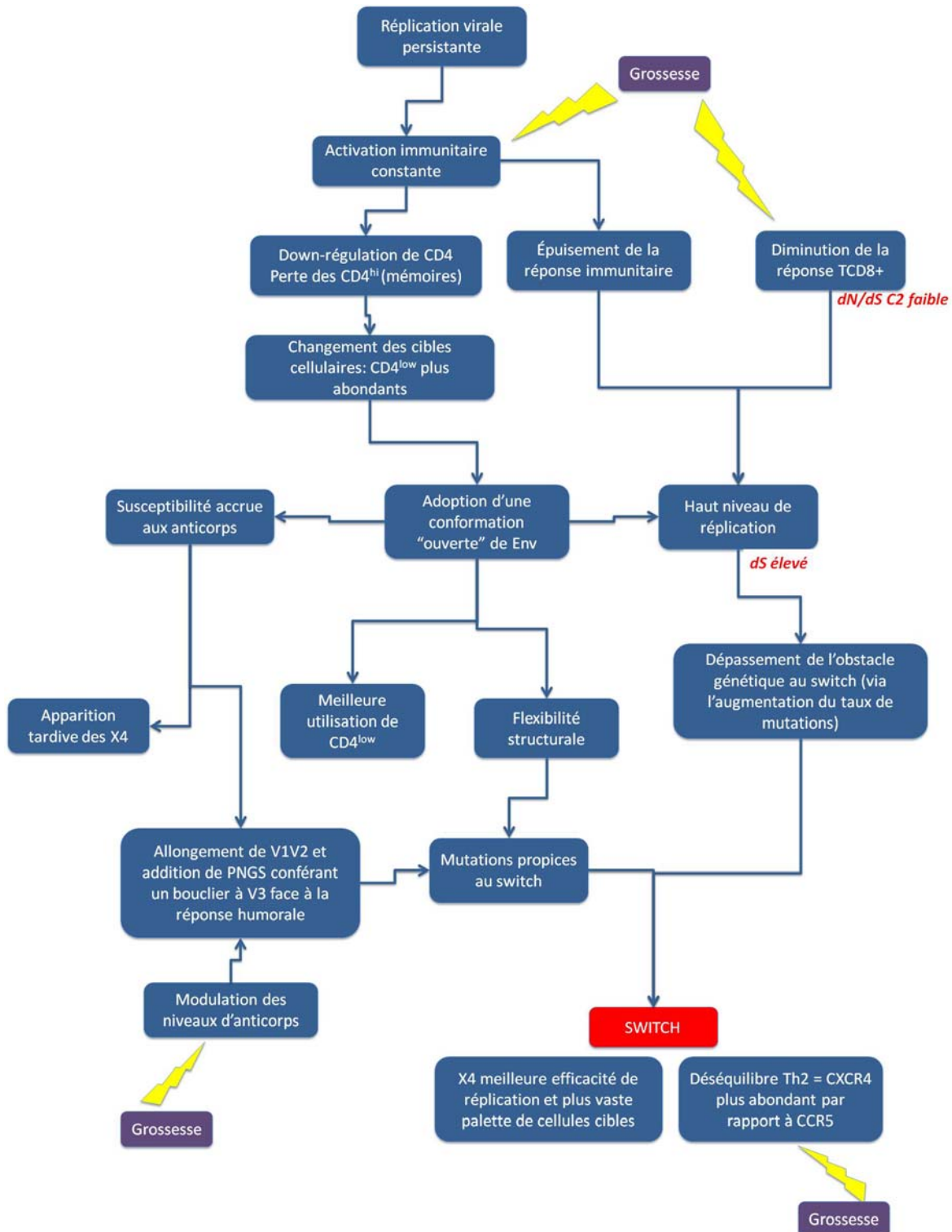
En résumé, les changements immunitaires induits par la grossesse pourraient intervenir à plusieurs niveaux, influençant de ce fait l'évolution du tropisme vers l'utilisation de CXCR4 :

- Une activation immunitaire associée à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires a été rapportée en grossesse (Mikyas *et al.* 1997; Sachdeva *et al.* 2008),

celle-ci pourrait accroître l'activation immunitaire déjà présente et caractéristique de l'infection à VIH-1.

- La réponse à médiation cellulaire antivirale (LTCD8<sup>+</sup>) diminuée en grossesse, reflétée par les valeurs de dN/dS de la région C2 de l'enveloppe plus faible chez les femmes enceintes (Chapitre 2), aurait pour conséquence de plus hauts niveaux de réplication virale (dS élevé chez les femmes enceintes par rapport aux femmes non-enceintes) (Canellada *et al.* 2002; Hel *et al.* 2010; Straub 2007; Zen *et al.* 2010).
- Les niveaux plus élevés d'anticorps observés chez la femme enceinte (Bisset *et al.* 1990; Wilson *et al.* 2001) pourraient favoriser le développement de variants avec une plus longue région V1V2.
- Le déséquilibre Th2 observé en grossesse pourrait également favoriser la disponibilité plus grande de cellules CXCR4<sup>+</sup> au détriment des cellules CCR5<sup>+</sup>.

Tous ces facteurs combinés sont responsables du switch du tropisme. Notre schéma intégratif fournit une explication sur la manière dont les changements immunitaires induits par la grossesse affectent le switch du tropisme. La grossesse pourrait en effet favoriser le switch chez des sujets arborant déjà des séquences X4, neuf mois étant un délai trop court pour amorcer et induire un switch via l'apparition de séquences X4 chez des sujets ayant une population virale exclusivement R5.



**Figure 27. Schéma intégratif de l'évolution du tropisme et de l'influence potentielle de la grossesse.**

Basé sur le modèle d'évolution du tropisme de Zhuang (Zhuang *et al.* 2012).

## CONCLUSION

Dans la présente thèse, nous avons montré pour la première fois qu'un switch du tropisme du VIH-1 de R5 vers X4 a lieu au cours de la grossesse, que la pression sélective appliquée sur le gène de l'enveloppe de la femme enceinte diffère légèrement de celle de la femme non-enceinte, et qu'un switch progressif du tropisme de R5 vers X4 est également observable à l'échelle de la population.

L'infection à VIH est une épidémie encore jeune dont beaucoup reste encore à découvrir. Nos données suggèrent d'une part que la grossesse pourrait impacter différemment l'évolution de la maladie à long terme chez les femmes par rapport aux hommes et d'autre part, que l'épidémie à VIH-1 évolue vers une plus grande virulence du virus, avec une plus grande résistance à la neutralisation par les anticorps combinée à une plus forte occurrence de switch chez les individus infectés récemment. Il sera nécessaire dans l'avenir d'étudier plus amplement la réponse immunitaire spécifique au VIH-1 et aussi l'évolution des gènes viraux chez la femme enceinte afin de lever un peu plus le voile sur les interactions complexes virus-hôte ayant lieu au cours de la grossesse. De plus, des études supplémentaires sur l'évolution du tropisme, mais plus généralement du virus, à l'échelle de la population permettront d'anticiper les changements éventuels dans les stratégies de traitement ARV mais aussi de développement de vaccins requis pour le contrôle de l'épidémie à long terme.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- (1995) Rates of mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa, America, and Europe: results from 13 perinatal studies. The Working Group on Mother-To-Child Transmission of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 8:506-10
- (2009) FDA advisory committee approves Selzentry. *AIDS Patient Care STDS* 23:987
- Abebe A, Demissie D, Goudsmit J, Brouwer M, Kuiken CL, Pollakis G, Schuitemaker H, Fontanet AL, Rinke de Wit TF (1999) HIV-1 subtype C syncytium- and non-syncytium-inducing phenotypes and coreceptor usage among Ethiopian patients with AIDS. *AIDS* 13:1305-11
- Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76:853-64
- Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR (2003) Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* 84:1649-61
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272:1955-8
- Allen TM, Altfeld M, Geer SC, Kalife ET, Moore C, O'Sullivan K M, Desouza I, Feeney ME, Eldridge RL, Maier EL, Kaufmann DE, Lahaie MP, Reyor L, Tanzi G, Johnston MN, Brander C, Draenert R, Rockstroh JK, Jessen H, Rosenberg ES, Mallal SA, Walker BD (2005a) Selective escape from CD8+ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J Virol* 79:13239-49
- Allen TM, Altfeld M, Yu XG, O'Sullivan KM, Lichterfeld M, Le Gall S, John M, Mothe BR, Lee PK, Kalife ET, Cohen DE, Freedberg KA, Strick DA, Johnston MN, Sette A, Rosenberg ES, Mallal SA, Goulder PJ, Brander C, Walker BD (2004) Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78:7069-78
- Allen TM, Yu XG, Kalife ET, Reyor LL, Lichterfeld M, John M, Cheng M, Allgaier RL, Mui S, Frahm N, Alter G, Brown NV, Johnston MN, Rosenberg ES, Mallal SA, Brander C, Walker BD, Altfeld M (2005b) De novo generation of escape variant-specific CD8+ T-cell responses following cytotoxic T-lymphocyte escape in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 79:12952-60
- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5:266-71
- Ammaranond P, Sanguansittianan S (2012) Mechanism of HIV antiretroviral drugs progress toward drug resistance. *Fundam Clin Pharmacol* 26:146-61
- Ammassari A, Trotta MP, Shalev N, Marconi P, Antinori A (2012) Beyond virological suppression: the role of adherence in the late HAART era. *Antivir Ther* 17:785-92
- Andersen JL, Planelles V (2005) The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res* 3:43-51
- Annunziato F, Galli G, Nappi F, Cosmi L, Manetti R, Maggi E, Ensoli B, Romagnani S (2000) Limited expression of R5-tropic HIV-1 in CCR5-positive type 1-polarized T cells explained by their ability to produce RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta. *Blood* 95:1167-74

- Arnold P, Himmels P, Weiss S, Decker TM, Markl J, Gatterdam V, Tampe R, Bartholomaeus P, Dietrich U, Durr R (2014) Antigenic and 3D structural characterization of soluble X4 and hybrid X4-R5 HIV-1 Env trimers. *Retrovirology* 11:42
- Artenstein AW, VanCott TC, Mascola JR, Carr JK, Hegerich PA, Gaywee J, Sanders-Buell E, Robb ML, Dayhoff DE, Thitivichianlert S, et al. (1995) Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 of distinct envelope subtypes in humans. *J Infect Dis* 171:805-10
- Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, Xiao Z, Veenstra TD, Conrad TP, Lempicki RA, McLaughlin S, Pascuccio M, Gopaul R, McNally J, Cruz CC, Censoplano N, Chung E, Reitano KN, Kottlil S, Goode DJ, Fauci AS (2008) HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* 9:301-9
- Arthur LO, Bess JW, Jr., Sowder RC, 2nd, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE (1992) Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 258:1935-8
- Asin SN, Heimberg AM, Eszterhas SK, Rollenhagen C, Howell AL (2008) Estradiol and progesterone regulate HIV type 1 replication in peripheral blood cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24:701-16
- Asjo B, Morfeldt-Manson L, Albert J, Biberfeld G, Karlsson A, Lidman K, Fenyo EM (1986) Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* 2:660-2
- Atkinson K, Dodds AJ, Concannon AJ, Biggs JC (1987) The development of the acquired immunodeficiency syndrome after bone-marrow transplantation. *The Medical journal of Australia* 147:510-2
- Atmar RL, Englund JA, Hammill H (1992) Complications of measles during pregnancy. *Clin Infect Dis* 14:217-26
- Avelino MM, Campos D, Jr., do Carmo Barbosa de Parada J, de Castro AM (2003) Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 108:19-24
- Baeten JM, Overbaugh J (2003) Measuring the infectiousness of persons with HIV-1: opportunities for preventing sexual HIV-1 transmission. *Curr HIV Res* 1:69-86
- Bailey JR, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN (2006) Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B\*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med* 203:1357-69
- Baker BM, Block BL, Rothchild AC, Walker BD (2009) Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin Biol Ther* 9:55-69
- Bar KJ, Tsao CY, Iyer SS, Decker JM, Yang Y, Bonsignori M, Chen X, Hwang KK, Montefiori DC, Liao HX, Hraber P, Fischer W, Li H, Wang S, Sterrett S, Keele BF, Gnanapavan V, Perelson AS, Korber BT, Georgiev I, McLellan JS, Pavlicek JW, Gao F, Haynes BF, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM (2012) Early low-titer neutralizing antibodies impede HIV-1 replication and select for virus escape. *PLoS Pathog* 8:e1002721
- Baribaud F, Pohlmann S, Doms RW (2001) The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and SIV attachment, infection, and transmission. *Virology* 286:1-6
- Barin F, Jourdain G, Brunet S, Ngo-Giang-Huong N, Weerawatgoompa S, Karnchanamayul W, Ariyadej S, Hansudewechakul R, Achalapong J, Yuthavisuthi P, Ngampiyaskul C,



- Bhakeecheep S, Hemwutthiphan C, Lallemand M (2006) Revisiting the role of neutralizing antibodies in mother-to-child transmission of HIV-1. *J Infect Dis* 193:1504-11
- Barin F, McLane MF, Allan JS, Lee TH, Groopman JE, Essex M (1985) Virus envelope protein of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science* 228:1094-6
- Barouch DH, Kunstman J, Kuroda MJ, Schmitz JE, Santra S, Peyerl FW, Krivulka GR, Beaudry K, Lifton MA, Gorgone DA, Montefiori DC, Lewis MG, Wolinsky SM, Letvin NL (2002) Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 415:335-9
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-71
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (2004) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev Invest Clin* 56:126-9
- Baudy H, Lopez-Vergès S, Berlioz-Torrent C (2008) TIP47, un cofacteur cellulaire essentiel à l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 dans la particule virale. *Virologie* 12
- Bello G, Casado C, Garcia S, Rodriguez C, del Romero J, Borderia AV, Lopez-Galindez C (2004) Plasma RNA viral load is not associated with intrapatient quasispecies heterogeneity in HIV-1 infection. *Arch Virol* 149:1761-71
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA (1998) A new classification for HIV-1. *Nature* 391:240
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700
- Bernstein HB, Tucker SP, Hunter E, Schutzbach JS, Compans RW (1994) Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is modified by O-linked oligosaccharides. *J Virol* 68:463-8
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB (1953) Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172:603-6
- Bisset LR, Fiddes TM, Gillett WR, Wilson PD, Griffin JF (1990) Altered humoral immunoregulation during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 23:4-9
- Blaak H, van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E, Schuitemaker H (2000) In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1269-74
- Blackard JT, Cohen DE, Mayer KH (2002) Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* 34:1108-14
- Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA (1996) A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184:1101-9

- Boily MC, Baggaley RF, Wang L, Masse B, White RG, Hayes RJ, Alary M (2009) Heterosexual risk of HIV-1 infection per sexual act: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Lancet Infect Dis* 9:118-29
- Boisvert S, Marchand M, Laviolette F, Corbeil J (2008) HIV-1 coreceptor usage prediction without multiple alignments: an application of string kernels. *Retrovirology* 5:110
- Borggren M, Repits J, Sterjovski J, Uchtenhagen H, Churchill MJ, Karlsson A, Albert J, Achour A, Gorry PR, Fenyo EM, Jansson M (2011) Increased sensitivity to broadly neutralizing antibodies of end-stage disease R5 HIV-1 correlates with evolution in Env glycosylation and charge. *PLoS One* 6:e20135
- Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB, Shaw GM (1997) Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 3:205-11
- Botarelli P, Houlden BA, Haigwood NL, Servis C, Montagna D, Abrignani S (1991) N-glycosylation of HIV-gp120 may constrain recognition by T lymphocytes. *J Immunol* 147:3128-32
- Bou-Habib DC, Roderiquez G, Oravecz T, Berman PW, Lusso P, Norcross MA (1994) Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virol* 68:6006-13
- Boyd MT, Simpson GR, Cann AJ, Johnson MA, Weiss RA (1993) A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J Virol* 67:3649-52
- Brambell FW, Halliday R, Brierley J, Hemmings WA (1954) Transference of passive immunity from mother to young. *Lancet* 266:964-5
- Bratt G, Leandersson AC, Albert J, Sandstrom E, Wahren B (1998) MT-2 tropism and CCR-5 genotype strongly influence disease progression in HIV-1-infected individuals. *AIDS* 12:729-36
- Brelot A, Heveker N, Pleskoff O, Sol N, Alizon M (1997) Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J Virol* 71:4744-51
- Brenchley JM, Douek DC (2008) HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* 1:23-30
- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC (2004) CD4<sup>+</sup> T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200:749-59
- Brennan RO, Durack DT (1981) Gay compromise syndrome. *Lancet* 2:1338-9
- Briggs JA, Krausslich HG (2011) The molecular architecture of HIV. *J Mol Biol* 410:491-500
- Brown AS, Surcel HM, Hinkka-Yli-Salomaki S, Cheslack-Postava K, Bao Y, Sourander A (2015) Maternal thyroid autoantibody and elevated risk of autism in a national birth cohort. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 57:86-92
- Brumme ZL, Brumme CJ, Heckerman D, Korber BT, Daniels M, Carlson J, Kadie C, Bhattacharya T, Chui C, Szinger J, Mo T, Hogg RS, Montaner JS, Frahm N, Brander C, Walker BD, Harrigan PR (2007) Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1. *PLoS Pathog* 3:e94

- Brumme ZL, Tao I, Szeto S, Brumme CJ, Carlson JM, Chan D, Kadie C, Frahm N, Brander C, Walker B, Heckerman D, Harrigan PR (2008) Human leukocyte antigen-specific polymorphisms in HIV-1 Gag and their association with viral load in chronic untreated infection. *AIDS* 22:1277-86
- Bunnik EM, Euler Z, Welkers MR, Boeser-Nunnink BD, Grijzen ML, Prins JM, Schuitemaker H (2010a) Adaptation of HIV-1 envelope gp120 to humoral immunity at a population level. *Nat Med* 16:995-7
- Bunnik EM, Lobbrecht MS, van Nuenen AC, Schuitemaker H (2010b) Escape from autologous humoral immunity of HIV-1 is not associated with a decrease in replicative capacity. *Virology* 397:224-30
- Bunnik EM, Pisas L, van Nuenen AC, Schuitemaker H (2008) Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82:7932-41
- Bunnik EM, Quakkelaar ED, van Nuenen AC, Boeser-Nunnink B, Schuitemaker H (2007) Increased neutralization sensitivity of recently emerged CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 strains compared to coexisting CCR5-using variants from the same patient. *J Virol* 81:525-31
- Bunnik EM, Swenson LC, Edo-Matas D, Huang W, Dong W, Frantzell A, Petropoulos CJ, Coakley E, Schuitemaker H, Harrigan PR, van 't Wout AB (2011) Detection of inferred CCR5- and CXCR4-using HIV-1 variants and evolutionary intermediates using ultra-deep pyrosequencing. *PLoS Pathog* 7:e1002106
- Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt RT (2004) HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* 5:233-6
- Butler DM, Pacold ME, Jordan PS, Richman DD, Smith DM (2009) The efficiency of single genome amplification and sequencing is improved by quantitation and use of a bioinformatics tool. *J Virol Methods* 162:280-3
- Cadosch D, Bonhoeffer S, Kouyos R (2012) Assessing the impact of adherence to anti-retroviral therapy on treatment failure and resistance evolution in HIV. *J R Soc Interface* 9:2309-20
- Caffrey M, Cai M, Kaufman J, Stahl SJ, Wingfield PT, Covell DG, Gronenborn AM, Clore GM (1998) Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO J* 17:4572-84
- Calarese DA, Scanlan CN, Zwick MB, Deechongkit S, Mimura Y, Kunert R, Zhu P, Wormald MR, Stanfield RL, Roux KH, Kelly JW, Rudd PM, Dwek RA, Katinger H, Burton DR, Wilson IA (2003) Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 300:2065-71
- Calvert C, Ronsmans C (2013) The contribution of hiv to pregnancy-related mortality: a systematic review and meta-analysis. *AIDS*
- Cameron DW, Heath-Chiozzi M, Danner S, Cohen C, Kravcik S, Maurath C, Sun E, Henry D, Rode R, Potthoff A, Leonard J (1998) Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. *Lancet* 351:543-9
- Canellada A, Blois S, Gentile T, Margni Idehu RA (2002) In vitro modulation of protective antibody responses by estrogen, progesterone and interleukin-6. *Am J Reprod Immunol* 48:334-43

- Cao J, McNevin J, Malhotra U, McElrath MJ (2003) Evolution of CD8+ T cell immunity and viral escape following acute HIV-1 infection. *J Immunol* 171:3837-46
- Carlson JM, Le AQ, Shahid A, Brumme ZL (2015) HIV-1 adaptation to HLA: a window into virus-host immune interactions. *Trends Microbiol*
- Carrillo A, Ratner L (1996) Human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-lymphoid cell lines: role of the V3 loop and C4 envelope determinants. *J Virol* 70:1301-9
- Carvajal-Rodriguez A, Posada D, Perez-Losada M, Keller E, Abrams EJ, Viscidi RP, Crandall KA (2008) Disease progression and evolution of the HIV-1 env gene in 24 infected infants. *Infect Genet Evol* 8:110-20
- Cashin K, Sterjovski J, Harvey KL, Ramsland PA, Churchill MJ, Gorry PR (2014) Covariance of charged amino acids at positions 322 and 440 of HIV-1 Env contributes to coreceptor specificity of subtype B viruses, and can be used to improve the performance of V3 sequence-based coreceptor usage prediction algorithms. *PLoS One* 9:e109771
- CDC (1982a) Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)-United States. *MMWR Weekly* 31
- CDC (1982b) Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma among Haitians in the United States. *MMWR* 353-361
- CDC (1982c) Unexplained Immunodeficiency and Opportunistic Infections in Infants- New York, New Jersey, California. *MMWR Weekly* 665-667
- Cecilia D, KewalRamani VN, O'Leary J, Volsky B, Nyambi P, Burda S, Xu S, Littman DR, Zolla-Pazner S (1998) Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J Virol* 72:6988-96
- Chaillon A, Braibant M, Hue S, Bencharif S, Enard D, Moreau A, Samri A, Agut H, Barin F (2012) Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) continues to evolve in presence of broadly neutralizing antibodies more than ten years after infection. *PLoS One* 7:e44163
- Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263-73
- Chaouat G (2007) The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 29:95-113
- Chaudhry A, Verghese DA, Das SR, Jameel S, George A, Bal V, Mayor S, Rath S (2009) HIV-1 Nef promotes endocytosis of cell surface MHC class II molecules via a constitutive pathway. *J Immunol* 183:2415-24
- Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC (2005) Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 433:834-41
- Chitnis A, Rawls D, Moore J (2000) Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:5-8
- Choe H, Farzan M (2009) Chapter 7. Tyrosine sulfation of HIV-1 coreceptors and other chemokine receptors. *Methods Enzymol* 461:147-70
- Choe H, Farzan M, Konkel M, Martin K, Sun Y, Marcon L, Cayabyab M, Berman M, Dorf ME, Gerard N, Gerard C, Sodroski J (1998) The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:6113-8

- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85:1135-48
- Choisy M, Woelk CH, Guegan JF, Robertson DL (2004) Comparative study of adaptive molecular evolution in different human immunodeficiency virus groups and subtypes. *J Virol* 78:1962-70
- Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, Kottlilil S, Moir S, Mican JM, Mullins JI, Ward DJ, Kovacs JA, Mannon PJ, Fauci AS (2008) Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 197:714-20
- Cihlar T, Ray AS (2010) Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral Res* 85:39-58
- Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, Orlovic D, Ketas T, Olson WC, Moore JP, Trkola A, Morris L (2003) The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol* 77:4449-56
- Clapham PR, Lu S (2011) Vaccinology: precisely tuned antibodies nab HIV. *Nature* 477:416-7
- Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M (1986) Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324:691-5
- Clevestig P, Pramanik L, Leitner T, Ehrnst A (2006) CCR5 use by human immunodeficiency virus type 1 is associated closely with the gp120 V3 loop N-linked glycosylation site. *J Gen Virol* 87:607-12
- Coakley E, Reeves JD, Huang W, Mangas-Ruiz M, Maurer I, Harskamp AM, Gupta S, Lie Y, Petropoulos CJ, Schuitemaker H, van 't Wout AB (2009) Comparison of human immunodeficiency virus type 1 tropism profiles in clinical samples by the Trofile and MT-2 assays. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4686-93
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P (1996) The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 2:1244-7
- Coetzer M, Cilliers T, Ping LH, Swanstrom R, Morris L (2006) Genetic characteristics of the V3 region associated with CXCR4 usage in HIV-1 subtype C isolates. *Virology* 356:95-105
- Coetzer M, Nedellec R, Cilliers T, Meyers T, Morris L, Mosier DE (2011) Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. *J Acquir Immune Defic Syndr* 56:9-15
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al. (1986) What to call the AIDS virus? *Nature* 321:10
- Coffin JM (1992) Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 176:143-64
- Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL, Murphy PM (1996) Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *J Leukoc Biol* 60:147-52
- Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM (1998) Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem* 273:23799-804

- Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T (1998) Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. N Engl J Med* 339:285-91
- Connell BJ, Michler K, Capovilla A, Venter WD, Stevens WS, Papathanasopoulos MA (2008) Emergence of X4 usage among HIV-1 subtype C: evidence for an evolving epidemic in South Africa. *AIDS* 22:896-9
- Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, VanDyke R, Bey M, Shearer W, Jacobson RL, et al. (1994) Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. N Engl J Med* 331:1173-80
- Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD (1993) Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 67:1772-7
- Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR (1997) Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* 185:621-8
- Constantin CM, Masopust D, Gourley T, Grayson J, Strickland OL, Ahmed R, Bonney EA (2007) Normal establishment of virus-specific memory CD8 T cell pool following primary infection during pregnancy. *J Immunol* 179:4383-9
- Cormier EG, Dragic T (2002) The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol* 76:8953-7
- Cormier EG, Persuh M, Thompson DA, Lin SW, Sakmar TP, Olson WC, Dragic T (2000) Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5762-7
- Cormier EG, Tran DN, Yukhayeva L, Olson WC, Dragic T (2001) Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complexes. *J Virol* 75:5541-9
- Cornelissen M, Pasternak AO, Grijsen ML, Zorgdrager F, Bakker M, Blom P, Prins JM, Jurriaans S, van der Kuyl AC (2012) HIV-1 dual infection is associated with faster CD4+ T-cell decline in a cohort of men with primary HIV infection. *Clin Infect Dis* 54:539-47
- Cowan MJ, Hellmann D, Chudwin D, Wara DW, Chang RS, Ammann AJ (1984) Maternal transmission of acquired immune deficiency syndrome. *Pediatrics* 73:382-6
- Crudeli CM, Aulicino PC, Rocco CA, Bologna R, Mangano A, Sen L (2012) Relevance of early detection of HIV type 1 SI/CXCR4-using viruses in vertically infected children. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:685-92
- Cummins NW, Badley AD (2010) Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010. *Cell Death Dis* 1:e99
- Daar ES, Li XL, Moudgil T, Ho DD (1990) High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6574-8
- Daley AJ, Thorpe S, Garland SM (2008) Varicella and the pregnant woman: prevention and management. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 48:26-33

- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-7
- Dash PK, Siddappa NB, Mangaiarkarasi A, Mahendarkar AV, Roshan P, Anand KK, Mahadevan A, Satishchandra P, Shankar SK, Prasad VR, Ranga U (2008) Exceptional molecular and coreceptor-requirement properties of molecular clones isolated from an Human Immunodeficiency Virus Type-1 subtype C infection. *Retrovirology* 5:25
- de Bethune MP (2010) Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Res* 85:75-90
- De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, Hoff E, Alnwick DJ, Rogers M, Shaffer N (2000) Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA* 283:1175-82
- De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J (1992) Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 66:6777-80
- De Leys R, Vanderborcht B, Vanden Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, Bernaerts R, Saman E, Nijs P, Willems B, et al. (1990) Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* 64:1207-16
- Decker JM, Bibollet-Ruche F, Wei X, Wang S, Levy DN, Wang W, Delaporte E, Peeters M, Derdeyn CA, Allen S, Hunter E, Saag MS, Hoxie JA, Hahn BH, Kwong PD, Robinson JE, Shaw GM (2005) Antigenic conservation and immunogenicity of the HIV coreceptor binding site. *J Exp Med* 201:1407-19
- Delicio AM, Milanez H, Amaral E, Morais SS, Lajos GJ, e Silva JL, Cecatti JG (2011) Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in a ten years period. *Reprod Health* 8:35
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-6
- Desormeaux A, Coutu M, Medjahed H, Pacheco B, Herschhorn A, Gu C, Xiang SH, Mao Y, Sodroski J, Finzi A (2012) The Highly-Conserved Layer 3 Component of the HIV-1 gp120 Inner Domain is Critical for CD4-required Conformational Transitions. *J Virol*
- Dickover RE, Garratty EM, Herman SA, Sim MS, Plaeger S, Boyer PJ, Keller M, Deveikis A, Stiehm ER, Bryson YJ (1996) Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission. Effect of maternal zidovudine treatment on viral load. *JAMA* 275:599-605
- Dimitrov AS, Louis JM, Bewley CA, Clore GM, Blumenthal R (2005) Conformational changes in HIV-1 gp41 in the course of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion and inactivation. *Biochemistry* 44:12471-9
- Dimonte S, Babakir-Mina M, Mercurio F, Di Pinto D, Ceccherini-Silberstein F, Svicher V, Perno CF (2012) Selected amino acid changes in HIV-1 subtype-C gp41 are associated with specific gp120(V3) signatures in the regulation of co-receptor usage. *Virus Res* 168:73-83

- Doe B, Steimer KS, Walker CM (1994) Induction of HIV-1 envelope (gp120)-specific cytotoxic T lymphocyte responses in mice by recombinant CHO cell-derived gp120 is enhanced by enzymatic removal of N-linked glycans. *Eur J Immunol* 24:2369-76
- Doms RW (2000) Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology* 276:229-37
- Doores KJ, Bonomelli C, Harvey DJ, Vasiljevic S, Dwek RA, Burton DR, Crispin M, Scanlan CN (2010) Envelope glycans of immunodeficiency virions are almost entirely oligomannose antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13800-5
- Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, Zhang TY, Sharron M, Cen YH, Wang ZX, Guo HH, Du JG, Accavitti MA, Doms RW, Peiper SC (1997) Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71:6305-14
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85:1149-58
- Doria A, Iaccarino L, Arienti S, Ghirardello A, Zampieri S, Rampudda ME, Cutolo M, Tincani A, Todesco S (2006a) Th2 immune deviation induced by pregnancy: the two faces of autoimmune rheumatic diseases. *Reprod Toxicol* 22:234-41
- Doria A, Iaccarino L, Sarzi-Puttini P, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Cutolo M, Todesco S (2006b) Estrogens in pregnancy and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 1069:247-56
- Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, Overgaard MT, Tulac S, Dong J, Thomas P, Giudice LC (2008) Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J Endocrinol* 196:67-77
- Draenert R, Verrill CL, Tang Y, Allen TM, Wurcel AG, Boczanowski M, Lechner A, Kim AY, Suscovich T, Brown NV, Addo MM, Walker BD (2004) Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78:630-41
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667-73
- Duenas-Decamp MJ, Peters P, Burton D, Clapham PR (2008) Natural resistance of human immunodeficiency virus type 1 to the CD4bs antibody b12 conferred by a glycan and an arginine residue close to the CD4 binding loop. *J Virol* 82:5807-14
- Dukers NH, Goudsmit J, de Wit JB, Prins M, Weverling GJ, Coutinho RA (2001) Sexual risk behaviour relates to the virological and immunological improvements during highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *AIDS* 15:369-78
- Dummer JS, Erb S, Breinig MK, Ho M, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, Ragni MV, Tzakis A, Makowka L, Van Thiel D, et al. (1989) Infection with human immunodeficiency virus in the Pittsburgh transplant population. A study of 583 donors and 1043 recipients, 1981-1986. *Transplantation* 47:134-40
- Dunfee RL, Thomas ER, Wang J, Kunstman K, Wolinsky SM, Gabuzda D (2007) Loss of the N-linked glycosylation site at position 386 in the HIV envelope V4 region enhances macrophage tropism and is associated with dementia. *Virology* 367:222-34
- Duri K, Soko W, Gumbo F, Kristiansen K, Mappingure M, Stray-Pedersen B, Muller F (2011) Genotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences:



- bioinformatics prediction of coreceptor usage among 28 infected mother-infant pairs in a drug-naive population. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:411-9
- Durik M, van Veghel R, Kuipers A, Rink R, Haas Jimoh Akanbi M, Moll G, Danser AH, Roks AJ (2012) The effect of the thioether-bridged, stabilized Angiotensin-(1-7) analogue cyclic ang-(1-7) on cardiac remodeling and endothelial function in rats with myocardial infarction. *Int J Hypertens* 2012:536426
- Earl PL, Moss B, Doms RW (1991) Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* 65:2047-55
- Edinger AL, Hoffman TL, Sharron M, Lee B, O'Dowd B, Doms RW (1998) Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* 249:367-78
- Edo-Matas D, Rachinger A, Setiawan LC, Boeser-Nunnink BD, van 't Wout AB, Lemey P, Schuitemaker H (2012) The evolution of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) envelope molecular properties and coreceptor use at all stages of infection in an HIV-1 donor-recipient pair. *Virology* 422:70-80
- Esbjornsson J, Mansson F, Martinez-Arias W, Vincic E, Biague AJ, da Silva ZJ, Fenyo EM, Norrgren H, Medstrand P (2010) Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02\_AG during late-stage disease--indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology* 7:23
- Evans JS, Nims T, Cooley J, Bradley W, Jagodzinski L, Zhou S, Melcher GP, Burke DS, Vahey M (1997) Serum levels of virus burden in early-stage human immunodeficiency virus type 1 disease in women. *J Infect Dis* 175:795-800
- Farzadegan H, Hoover DR, Astemborski J, Lyles CM, Margolick JB, Markham RB, Quinn TC, Vlahov D (1998) Sex differences in HIV-1 viral load and progression to AIDS. *Lancet* 352:1510-4
- Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H (1999) Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96:667-76
- Fauci AS, Johnston MI, Dieffenbach CW, Burton DR, Hammer SM, Hoxie JA, Martin M, Overbaugh J, Watkins DI, Mahmoud A, Greene WC (2008) HIV vaccine research: the way forward. *Science* 321:530-2
- Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D (1996) Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Annals of internal medicine* 124:654-63
- FDA (2013) Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. <http://www.fda.gov>. <http://www.fda.gov>. 2013
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-7
- Fenouillet E, Jones IM (1995) The glycosylation of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) is important for the efficient intracellular transport of the envelope precursor gp160. *J Gen Virol* 76 ( Pt 6):1509-14
- Flomenberg N, Comenzo RL, Badel K, Calandra G (2010) Plerixafor (Mozobil) alone to mobilize hematopoietic stem cells from multiple myeloma patients for autologous transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:695-700

- Fortin JF, Barbeau B, Hedman H, Lundgren E, Tremblay MJ (1999) Role of the leukocyte function antigen-1 conformational state in the process of human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and virus infection. *Virology* 257:228-38
- Fouchier RA, Broersen SM, Brouwer M, Tersmette M, Van't Wout AB, Groenink M, Schuitemaker H (1995) Temporal relationship between elongation of the HIV type 1 glycoprotein 120 V2 domain and the conversion toward a syncytium-inducing phenotype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11:1473-8
- Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H (1992) Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 66:3183-7
- Frankel AD, Young JA (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67:1-25
- Franklin RD, Kutteh WH (1999) Characterization of immunoglobulins and cytokines in human cervical mucus: influence of exogenous and endogenous hormones. *J Reprod Immunol* 42:93-106
- Freeman DW, Barno A (1959) Deaths from Asian influenza associated with pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 78:1172-5
- French R, Brocklehurst P (1998) The effect of pregnancy on survival in women infected with HIV: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Br J Obstet Gynaecol* 105:827-35
- Galli G, Annunziato F, Mavilia C, Romagnani P, Cosmi L, Manetti R, Pupilli C, Maggi E, Romagnani S (1998) Enhanced HIV expression during Th2-oriented responses explained by the opposite regulatory effect of IL-4 and IFN-gamma of fusin/CXCR4. *Eur J Immunol* 28:3280-90
- Gandhi M, Bacchetti P, Miotti P, Quinn TC, Veronese F, Greenblatt RM (2002) Does patient sex affect human immunodeficiency virus levels? *Clin Infect Dis* 35:313-22
- Ganeshan S, Dickover RE, Korber BT, Bryson YJ, Wolinsky SM (1997) Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. *J Virol* 71:663-77
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397:436-41
- Garcia JV, Miller AD (1992) Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Research in virology* 143:52-5
- Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A, Skrabal K, Zahonero N, Carlos S, Garcia F, Faudon JL, Soriano V, de Mendoza C (2008) Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Clin Microbiol* 46:887-91
- Garsenstein M, Pollak VE, Kark RM (1962) Systemic lupus erythematosus and pregnancy. *N Engl J Med* 267:165-9
- Geels MJ, Cornelissen M, Schuitemaker H, Anderson K, Kwa D, Maas J, Dekker JT, Baan E, Zorgdrager F, van den Burg R, van Beelen M, Lukashov VV, Fu TM, Paxton WA, van der Hoek L, Dubey SA, Shiver JW, Goudsmit J (2003) Identification of sequential viral escape mutants associated with altered T-cell responses in a human immunodeficiency virus type 1-infected individual. *J Virol* 77:12430-40

- Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-97
- Gellin BG, Broome CV, Bibb WF, Weaver RE, Gaventa S, Mascola L (1991) The epidemiology of listeriosis in the United States--1986. Listeriosis Study Group. *Am J Epidemiol* 133:392-401
- Gerhardt M, Mloka D, Tovanabutra S, Sanders-Buell E, Hoffmann O, Maboko L, Mmbando D, Birx DL, McCutchan FE, Hoelscher M (2005) In-depth, longitudinal analysis of viral quasispecies from an individual triply infected with late-stage human immunodeficiency virus type 1, using a multiple PCR primer approach. *J Virol* 79:8249-61
- Gervais A, Bacq Y, Bernuau J, Martinot M, Auperin A, Boyer N, Kilani A, Erlinger S, Valla D, Marcellin P (2000) Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 32:293-9
- Gilbert MT, Rambaut A, Wlasiuk G, Spira TJ, Pitchenik AE, Worobey M (2007) The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18566-70
- Goldenberg RL, Vermund SH, Goepfert AR, Andrews WW (1998) Choriodecidual inflammation: a potentially preventable cause of perinatal HIV-1 transmission? *Lancet* 352:1927-30
- Gomes V, Mesquita A, Capela C (2015) Autoimmune diseases and pregnancy: analysis of a series of cases. *BMC Res Notes* 8:216
- Gonzalez N, Perez-Olmeda M, Mateos E, Cascajero A, Alvarez A, Spijkers S, Garcia-Perez J, Sanchez-Palomino S, Ruiz-Mateos E, Leal M, Alcamí J (2010) A sensitive phenotypic assay for the determination of human immunodeficiency virus type 1 tropism. *J Antimicrob Chemother* 65:2493-501
- Gonzalez-Serna A, Leal M, Genebat M, Abad MA, Garcia-Perganeda A, Ferrando-Martinez S, Ruiz-Mateos E (2010) TROCAI (tropism coreceptor assay information): a new phenotypic tropism test and its correlation with Trofile enhanced sensitivity and genotypic approaches. *J Clin Microbiol* 48:4453-8
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 305:1425-31
- Goulder PJ, Watkins DI (2004) HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 4:630-40
- Granados-Gonzalez V, Claret J, Berlier W, Vincent N, Urcuqui-Inchima S, Lucht F, Defontaine C, Pinter A, Genin C, Riffard S (2008) Opposite immune reactivity of serum IgG and secretory IgA to conformational recombinant proteins mimicking V1/V2 domains of three different HIV type 1 subtypes depending on glycosylation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24:289-99
- Gray ES, Moody MA, Wibmer CK, Chen X, Marshall D, Amos J, Moore PL, Foulger A, Yu JS, Lambson B, Abdool Karim S, Whitesides J, Tomaras GD, Haynes BF, Morris L, Liao HX (2011) Isolation of a monoclonal antibody that targets the alpha-2 helix of

- gp120 and represents the initial autologous neutralizing-antibody response in an HIV-1 subtype C-infected individual. *J Virol* 85:7719-29
- Gray ES, Moore PL, Choge IA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Li H, Leseka N, Treurnicht F, Mlisana K, Shaw GM, Karim SS, Williamson C, Morris L (2007) Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* 81:6187-96
- Gray RH, Li X, Kigozi G, Serwadda D, Brahmabhatt H, Wabwire-Mangen F, Nalugoda F, Kiddugavu M, Sewankambo N, Quinn TC, Reynolds SJ, Wawer MJ (2005) Increased risk of incident HIV during pregnancy in Rakai, Uganda: a prospective study. *Lancet* 366:1182-8
- Gray RR, Tatem AJ, Lamers S, Hou W, Laeyendecker O, Serwadda D, Sewankambo N, Gray RH, Wawer M, Quinn TC, Goodenow MM, Salemi M (2009) Spatial phylodynamics of HIV-1 epidemic emergence in east Africa. *AIDS* 23:F9-F17
- Groenink M, Fouchier RA, Broersen S, Baker CH, Koot M, van't Wout AB, Huisman HG, Miedema F, Tersmette M, Schuitemaker H (1993) Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration. *Science* 260:1513-6
- Guay LA, Musoke P, Fleming T, Bagenda D, Allen M, Nakabiito C, Sherman J, Bakaki P, Ducar C, Deseyve M, Emel L, Mirochnick M, Fowler MG, Mofenson L, Miotti P, Dransfield K, Bray D, Mmiro F, Jackson JB (1999) Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* 354:795-802
- Gupta S, Neogi U, Srinivasa H, Banerjea AC, Shet A (2013) HIV-1 co-receptor tropism in India: increasing proportion of X4-tropism in subtype C strains over two decades. *J Acquir Immune Defic Syndr*
- Haas A, Zimmermann K, Oxenius A (2011) Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. *J Virol* 85:12102-13
- Halpern V, Ogunsola F, Obunge O, Wang CH, Onyejebu N, Oduyebo O, Taylor D, McNeil L, Mehta N, Umo-Otong J, Otusanya S, Crucitti T, Abdellati S (2008) Effectiveness of cellulose sulfate vaginal gel for the prevention of HIV infection: results of a Phase III trial in Nigeria. *PLoS One* 3:e3784
- Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, Henry WK, Lederman MM, Phair JP, Niu M, Hirsch MS, Merigan TC (1996) A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med* 335:1081-90
- Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N (1985) Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229:563-6
- Harouse JM, Buckner C, Gettie A, Fuller R, Bohm R, Blanchard J, Cheng-Mayer C (2003) CD8+ T cell-mediated CXC chemokine receptor 4-simian/human immunodeficiency virus suppression in dually infected rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10977-82
- Harrigan PR, Geretti AM (2011) Genotypic tropism testing: evidence-based or leap of faith? *AIDS* 25:257-64
- Harris RE, Rhoades ER (1965) Varicella Pneumonia Complicating Pregnancy. Report of a Case and Review of Literature. *Obstet Gynecol* 25:734-40

- Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP (2005) V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:171-89
- Hay CM, Ruhl DJ, Basgoz NO, Wilson CC, Billingsley JM, DePasquale MP, D'Aquila RT, Wolinsky SM, Crawford JM, Montefiori DC, Walker BD (1999) Lack of viral escape and defective in vivo activation of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes in rapidly progressive infection. *J Virol* 73:5509-19
- Hazenber MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, Miedema F, Hamann D (2000) T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 95:249-55
- He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D (1997) CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 385:645-9
- He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR (1995) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *Journal of virology* 69:6705-11
- Heeney JL, Dalgleish AG, Weiss RA (2006) Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 313:462-6
- Hel Z, Stringer E, Mestecky J (2010) Sex steroid hormones, hormonal contraception, and the immunobiology of human immunodeficiency virus-1 infection. *Endocr Rev* 31:79-97
- Hemelaar J (2012) The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 18:182-92
- Henrich TJ, Kuritzkes DR (2013) HIV-1 entry inhibitors: recent development and clinical use. *Curr Opin Virol*
- Hershow RC, Riestler KA, Lew J, Quinn TC, Mofenson LM, Davenny K, Landesman S, Cotton D, Hanson IC, Hillyer GV, Tang HB, Thomas DL (1997) Increased vertical transmission of human immunodeficiency virus from hepatitis C virus-coinfected mothers. *Women and Infants Transmission Study. J Infect Dis* 176:414-20
- Heveker N (2001) Chemokine receptors as anti-retroviral targets. *Curr Drug Targets* 2:21-39
- Hill AL, Rosenbloom DI, Nowak MA (2012) Evolutionary dynamics of HIV at multiple spatial and temporal scales. *J Mol Med (Berl)* 90:543-61
- Hill JA (1995) T-helper 1-type immunity to trophoblast: evidence for a new immunological mechanism for recurrent abortion in women. *Hum Reprod* 10 Suppl 2:114-20
- hiv.lanl.gov HIV databases. <http://www.hiv.lanl.gov/>.
- hiv.lanl.gov <http://www.hiv.lanl.gov/>.
- Hocke C, Morlat P, Chene G, Dequae L, Dabis F (1995) Prospective cohort study of the effect of pregnancy on the progression of human immunodeficiency virus infection. The Groupe d'Epidemiologie Clinique Du SIDA en Aquitaine. *Obstet Gynecol* 86:886-91
- Hoffman NG, Seillier-Moisewitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R (2002) Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol* 76:3852-64
- Hogue IB, Grover JR, Soheilian F, Nagashima K, Ono A (2011) Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J Virol* 85:9749-66

- Horne WS, Johnson LM, Ketas TJ, Klasse PJ, Lu M, Moore JP, Gellman SH (2009) Structural and biological mimicry of protein surface recognition by alpha/beta-peptide foldamers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14751-6
- Huang CC, Lam SN, Acharya P, Tang M, Xiang SH, Hussan SS, Stanfield RL, Robinson J, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Bewley CA, Kwong PD (2007a) Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* 317:1930-4
- Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD (2005) Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310:1025-8
- Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, Whitcomb JM, Young AM, Donnell D, Mmiro F, Musoke P, Guay LA, Jackson JB, Parkin NT, Petropoulos CJ (2007b) Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *J Virol* 81:7885-93
- Huang W, Eshleman SH, Toma J, Stawiski E, Whitcomb JM, Jackson JB, Guay L, Musoke P, Parkin N, Petropoulos CJ (2009) Vertical transmission of X4-tropic and dual-tropic HIV-1 in five Ugandan mother-infant pairs. *AIDS* 23:1903-8
- Huang W, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Reeves JD, Whitcomb JM, Parkin N, Petropoulos CJ (2008) Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* 82:5584-93
- Huang X, Barchi JJ, Jr., Lung FD, Roller PP, Nara PL, Muschik J, Garrity RR (1997) Glycosylation affects both the three-dimensional structure and antibody binding properties of the HIV-1IIIB GP120 peptide RP135. *Biochemistry* 36:10846-56
- Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA (1996) The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 2:1240-3
- Hygino J, Vieira MM, Kasahara TM, Xavier LF, Blanco B, Guillermo LV, Filho RG, Saramago CS, Lima-Silva AA, Oliveira AL, Guimaraes V, Andrade AF, Bento CA (2012) The impact of pregnancy on the HIV-1-specific T cell function in infected pregnant women. *Clin Immunol* 145:177-188
- Irlbeck DM, Amrine-Madsen H, Kitrinis KM, Labranche CC, Demarest JF (2008) Chemokine (C-C motif) receptor 5-using envelopes predominate in dual/mixed-tropic HIV from the plasma of drug-naive individuals. *AIDS* 22:1425-31
- Jacobson JM, Saag MS, Thompson MA, Fischl MA, Liporace R, Reichman RC, Redfield RR, Fichtenbaum CJ, Zingman BS, Patel MC, Murga JD, Pemrick SM, D'Ambrosio P, Michael M, Kroger H, Ly H, Rotshteyn Y, Buice R, Morris SA, Stavola JJ, Maddon PJ, Kremer AB, Olson WC (2008) Antiviral activity of single-dose PRO 140, a CCR5 monoclonal antibody, in HIV-infected adults. *J Infect Dis* 198:1345-52
- Janeway CA, Jr. (1992) The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 10:645-74
- Jansson M, Backstrom E, Bjorndal A, Holmberg V, Rossi P, Fenyo EM, Popovic M, Albert J, Wigzell H (1999) Coreceptor usage and RANTES sensitivity of non-syncytium-inducing HIV-1 isolates obtained from patients with AIDS. *J Hum Virol* 2:325-38

- Jansson M, Backstrom E, Scarlatti G, Bjorndal A, Matsuda S, Rossi P, Albert J, Wigzell H (2001) Length variation of glycoprotein 120 V2 region in relation to biological phenotypes and coreceptor usage of primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1405-14
- Japour AJ, Mayers DL, Johnson VA, Kuritzkes DR, Beckett LA, Arduino JM, Lane J, Black RJ, Reichelderfer PS, D'Aquila RT, et al. (1993) Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. The RV-43 Study Group, the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee Resistance Working Group. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1095-101
- Jenkins C, Roberts J, Wilson R, MacLean MA, Shilito J, Walker JJ (2000) Evidence of a T(H) 1 type response associated with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 73:1206-8
- Jensen MA, Coetzer M, van 't Wout AB, Morris L, Mullins JI (2006) A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol* 80:4698-704
- Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI (2003) Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* 77:13376-88
- Jin X, Roberts CG, Nixon DF, Cao Y, Ho DD, Walker BD, Muldoon M, Korber BT, Koup RA (1998) Longitudinal and cross-sectional analysis of cytotoxic T lymphocyte responses and their relationship to vertical human immunodeficiency virus transmission. ARIEL Project Investigators. *J Infect Dis* 178:1317-26
- Johansson ED (1969) Plasma levels of progesterone in pregnancy measured by a rapid competitive protein binding technique. *Acta Endocrinol (Copenh)* 61:607-17
- Jolette E, Akouamba B, Samson J, Bernard N, Lapointe N, Boucher M, Soudeyins H (2015) Longitudinal study of HIV-specific cytotoxic T lymphocyte activity during pregnancy. *En préparation*
- Jones NA, Wei X, Flower DR, Wong M, Michor F, Saag MS, Hahn BH, Nowak MA, Shaw GM, Borrow P (2004) Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 200:1243-56
- Jourdan P, Abbal C, Noraz N, Hori T, Uchiyama T, Vendrell JP, Bousquet J, Taylor N, Pene J, Yssel H (1998) IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. *J Immunol* 160:4153-7
- Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *Journal of virology* 69:6304-13
- Julien JP, Cupo A, Sok D, Stanfield RL, Lyumkis D, Deller MC, Klasse PJ, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Ward AB, Wilson IA (2013) Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342:1477-83
- Kaleebu P, Nankya IL, Yirrell DL, Shafer LA, Kyosiimire-Lugemwa J, Lule DB, Morgan D, Beddows S, Weber J, Whitworth JA (2007) Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45:28-33

- Karlsson A, Parsmyr K, Sandstrom E, Fenyo EM, Albert J (1994) MT-2 cell tropism as prognostic marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Microbiol* 32:364-70
- Karmon SL, Markowitz M (2013) Next-generation integrase inhibitors : where to after raltegravir? *Drugs* 73:213-28
- Karn J, Stoltzfus CM (2012) Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006916
- Katzenstein DA, Hammer SM, Hughes MD, Gundacker H, Jackson JB, Fiscus S, Rasheed S, Elbeik T, Reichman R, Japour A, Merigan TC, Hirsch MS (1996) The relation of virologic and immunologic markers to clinical outcomes after nucleoside therapy in HIV-infected adults with 200 to 500 CD4 cells per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Virology Study Team. *N Engl J Med* 335:1091-8
- Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, Sun C, Grayson T, Wang S, Li H, Wei X, Jiang C, Kirchherr JL, Gao F, Anderson JA, Ping LH, Swanstrom R, Tomaras GD, Blattner WA, Goepfert PA, Kilby JM, Saag MS, Delwart EL, Busch MP, Cohen MS, Montefiori DC, Haynes BF, Gaschen B, Athreya GS, Lee HY, Wood N, Seoighe C, Perelson AS, Bhattacharya T, Korber BT, Hahn BH, Shaw GM (2008) Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7552-7
- Kelleher AD, Long C, Holmes EC, Allen RL, Wilson J, Conlon C, Workman C, Shaunak S, Olson K, Goulder P, Brander C, Ogg G, Sullivan JS, Dyer W, Jones I, McMichael AJ, Rowland-Jones S, Phillips RE (2001) Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of experimental medicine* 193:375-86
- Kestler HW, 3rd, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC (1991) Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65:651-62
- Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D (1989) Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *Journal of virology* 63:3708-13
- Koff WC (2012) HIV vaccine development: challenges and opportunities towards solving the HIV vaccine-neutralizing antibody problem. *Vaccine* 30:4310-5
- Koibuchi T, Allen TM, Lichterfeld M, Mui SK, O'Sullivan KM, Trocha A, Kalams SA, Johnson RP, Walker BD (2005) Limited sequence evolution within persistently targeted CD8 epitopes in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 79:8171-81
- Kolte L, Gaardbo JC, Karlsson I, Sorensen AL, Ryder LP, Skogstrand K, Ladelund S, Nielsen SD (2011) Dysregulation of CD4+CD25+CD127lowFOXP3+ regulatory T cells in HIV-infected pregnant women. *Blood* 117:1861-8
- Koning FA, Kwa D, Boeser-Nunnink B, Dekker J, Vingerhoed J, Hiemstra H, Schuitemaker H (2003) Decreasing sensitivity to RANTES (regulated on activation, normally T cell-expressed and -secreted) neutralization of CC chemokine receptor 5-using, non-syncytium-inducing virus variants in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 188:864-72



- Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M (1993) Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 118:681-8
- Koot M, van 't Wout AB, Kootstra NA, de Goede RE, Tersmette M, Schuitemaker H (1996) Relation between changes in cellular load, evolution of viral phenotype, and the clonal composition of virus populations in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 173:349-54
- Koot M, van Leeuwen R, de Goede RE, Keet IP, Danner S, Eeftinck Schattenkerk JK, Reiss P, Tersmette M, Lange JM, Schuitemaker H (1999) Conversion rate towards a syncytium-inducing (SI) phenotype during different stages of human immunodeficiency virus type 1 infection and prognostic value of SI phenotype for survival after AIDS diagnosis. *J Infect Dis* 179:254-8
- Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG, Coutinho RA, Miedema F, Tersmette M (1992) HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 6:49-54
- Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V (2001) Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* 58:19-42
- Korber BT, Farber RM, Wolpert DH, Lapedes AS (1993) Covariation of mutations in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein: an information theoretic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7176-80
- Kotler DP, Gaetz HP, Lange M, Klein EB, Holt PR (1984) Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 101:421-8
- Koulinska IN, Villamor E, Msamanga G, Fawzi W, Blackard J, Renjifo B, Essex M (2006) Risk of HIV-1 transmission by breastfeeding among mothers infected with recombinant and non-recombinant HIV-1 genotypes. *Virus Res* 120:191-8
- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD (1994) Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68:4650-5
- Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M (2006) Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis* 6:726-32
- Kramski M, Stratov I, Kent SJ (2015) The role of HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV prevention and the influence of the HIV-1 Vpu protein. *AIDS* 29:137-44
- Krausslich HG (1991) Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3213-7
- Kwa D, van Rij RP, Boeser-Nunnink B, Vingerhoed J, Schuitemaker H (2003) Association between an interleukin-4 promoter polymorphism and the acquisition of CXCR4 using HIV-1 variants. *AIDS* 17:981-5
- Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Kim CE (2005) T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chem Immunol Allergy* 88:64-79

- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-59
- Kwong PD, Wyatt R, Sattentau QJ, Sodroski J, Hendrickson WA (2000) Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* 74:1961-72
- Labrosse B, Treboute C, Brelot A, Alizon M (2001) Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor. *J Virol* 75:5457-64
- Lallemant M, Jourdain G, Le Coeur S, Mary JY, Ngo-Giang-Huong N, Koetsawang S, Kanshana S, McIntosh K, Thaineua V (2004) Single-dose perinatal nevirapine plus standard zidovudine to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in Thailand. *N Engl J Med* 351:217-28
- Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao HX, Parks RJ, Hicks CB, Owzar K, Tomaras GD, Montefiori DC, Haynes BF, Delfraissy JF (2009) Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 23:897-906
- Lamers SL, Salemi M, McGrath MS, Fogel GB (2008) Prediction of R5, X4, and R5X4 HIV-1 coreceptor usage with evolved neural networks. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 5:291-300
- Land A, Braakman I (2001) Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* 83:783-90
- Land A, Zonneveld D, Braakman I (2003) Folding of HIV-1 envelope glycoprotein involves extensive isomerization of disulfide bonds and conformation-dependent leader peptide cleavage. *FASEB J* 17:1058-67
- Landi A, Iannucci V, Nuffel AV, Meuwissen P, Verhasselt B (2011) One protein to rule them all: modulation of cell surface receptors and molecules by HIV Nef. *Curr HIV Res* 9:496-504
- Lapointe N, Michaud J, Pekovic D, Chausseau JP, Dupuy JM (1985) Transplacental transmission of HTLV-III virus. *N Engl J Med* 312:1325-6
- Lau KA, Wong JJ (2013) Current Trends of HIV Recombination Worldwide. *Infect Dis Rep* 5:e4
- Lavine CL, Lao S, Montefiori DC, Haynes BF, Sodroski JG, Yang X (2012) High-mannose glycan-dependent epitopes are frequently targeted in broad neutralizing antibody responses during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 86:2153-64
- Lavreys L, Baeten JM, Martin HL, Jr., Overbaugh J, Mandaliya K, Ndinya-Achola J, Kreiss JK (2004) Hormonal contraception and risk of HIV-1 acquisition: results of a 10-year prospective study. *AIDS* 18:695-7
- Le Moing V, Taieb A, Longuet P, Lewden C, Delcey V, Drobacheff MC, Chene G, Leport C (2008) Pregnancy may be followed by an inflexion of the immune reconstitution in HIV-infected women who receive antiretroviral drugs before conception. *HIV Med* 9:897-900
- Le Rouzic E, Mousnier A, Rustum C, Stutz F, Hallberg E, Dargemont C, Benichou S (2002) Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem* 277:45091-8

- Leal E, Janini M, Diaz RS (2007) Selective pressures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) during pediatric infection. *Infect Genet Evol* 7:694-707
- Lebon G, Tate CG (2012) [G protein-coupled receptors in the spotlight]. *Med Sci (Paris)* 28:876-82
- Lee AW, Mitra D, Laurence J (1997) Interaction of pregnancy steroid hormones and zidovudine in inhibition of HIV type 1 replication in monocytoid and placental Hofbauer cells: implications for the prevention of maternal-fetal transmission of HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:1235-42
- Lee S, Tiffany HL, King L, Murphy PM, Golding H, Zaitseva MB (2000) CCR8 on human thymocytes functions as a human immunodeficiency virus type 1 coreceptor. *J Virol* 74:6946-52
- Lemey P, Kosakovsky Pond SL, Drummond AJ, Pybus OG, Shapiro B, Barroso H, Taveira N, Rambaut A (2007) Synonymous substitution rates predict HIV disease progression as a result of underlying replication dynamics. *PLoS Comput Biol* 3:e29
- Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen A, Kaiser R (2007) Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol* 25:1407-10
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ (1990) Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 265:10373-82
- Letvin NL, Walker BD (2003) Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 9:861-6
- Levitz M, Young BK (1977) Estrogens in pregnancy. *Vitam Horm* 35:109-47
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225:840-2
- Lewis JJ, Ronsmans C, Ezech A, Gregson S (2004) The population impact of HIV on fertility in sub-Saharan Africa. *AIDS* 18 Suppl 2:S35-43
- Li H, Chien PC, Jr., Tuen M, Visciano ML, Cohen S, Blais S, Xu CF, Zhang HT, Hioe CE (2008) Identification of an N-linked glycosylation in the C4 region of HIV-1 envelope gp120 that is critical for recognition of neighboring CD4 T cell epitopes. *J Immunol* 180:4011-21
- Li H, Xu CF, Blais S, Wan Q, Zhang HT, Landry SJ, Hioe CE (2009) Proximal glycans outside of the epitopes regulate the presentation of HIV-1 envelope gp120 helper epitopes. *J Immunol* 182:6369-78
- Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY (2005) Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res* 15:923-34
- Li Y, Luo L, Rasool N, Kang CY (1993) Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* 67:584-8
- Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM (1997) STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med* 185:2015-23
- Lifson JD, Reyes GR, McGrath MS, Stein BS, Engleman EG (1986) AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* 232:1123-7

- Lin PF, Blair W, Wang T, Spicer T, Guo Q, Zhou N, Gong YF, Wang HG, Rose R, Yamanaka G, Robinson B, Li CB, Fridell R, Deminie C, Demers G, Yang Z, Zadjura L, Meanwell N, Colonno R (2003) A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11013-8
- Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S (2008) Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 455:109-13
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367-77
- Liu Y, McNevin J, Cao J, Zhao H, Genowati I, Wong K, McLaughlin S, McSweyn MD, Diem K, Stevens CE, Maenza J, He H, Nickle DC, Shriner D, Holte SE, Collier AC, Corey L, McElrath MJ, Mullins JI (2006) Selection on the human immunodeficiency virus type 1 proteome following primary infection. *J Virol* 80:9519-29
- Liu Y, McNevin J, Zhao H, Tebit DM, Troyer RM, McSweyn M, Ghosh AK, Shriner D, Arts EJ, McElrath MJ, Mullins JI (2007) Evolution of human immunodeficiency virus type 1 cytotoxic T-lymphocyte epitopes: fitness-balanced escape. *J Virol* 81:12179-88
- Liu Y, Rao U, McClure J, Konopa P, Manochewa S, Kim M, Chen L, Troyer RM, Tebit DM, Holte S, Arts EJ, Mullins JI (2014) Impact of mutations in highly conserved amino acids of the HIV-1 Gag-p24 and Env-gp120 proteins on viral replication in different genetic backgrounds. *PLoS One* 9:e94240
- Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-5
- Lombardi F, Nakamura KJ, Chen T, Sobrera ER, Tobin NH, Aldrovandi GM (2015) A Conserved Glycan in the C2 Domain of HIV-1 Envelope Acts as a Molecular Switch to Control X4 Utilization by Clonal Variants with Identical V3 Loops. *PLoS One* 10:e0128116
- Long EM, Rainwater SM, Lavreys L, Mandaliya K, Overbaugh J (2002) HIV type 1 variants transmitted to women in Kenya require the CCR5 coreceptor for entry, regardless of the genetic complexity of the infecting virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:567-76
- Losman B, Bolmstedt A, Schonning K, Bjorndal A, Westin C, Fenyo EM, Olofsson S (2001) Protection of neutralization epitopes in the V3 loop of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 by N-linked oligosaccharides in the V1 region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1067-76
- Luria S, Chambers I, Berg P (1991) Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:5326-30
- Ly A, Stamatatos L (2000) V2 loop glycosylation of the human immunodeficiency virus type 1 SF162 envelope facilitates interaction of this protein with CD4 and CCR5 receptors and protects the virus from neutralization by anti-V3 loop and anti-CD4 binding site antibodies. *J Virol* 74:6769-76
- Lyde CB (1997) Pregnancy in patients with Hansen disease. *Arch Dermatol* 133:623-7
- Lyles CM, Dorrucci M, Vlahov D, Pezzotti P, Angarano G, Sinicco A, Alberici F, Alcorn TM, Vella S, Rezza G (1999) Longitudinal human immunodeficiency virus type 1 load in the italian seroconversion study: correlates and temporal trends of virus load. *J Infect Dis* 180:1018-24

- Lyumkis D, Julien JP, de Val N, Cupo A, Potter CS, Klasse PJ, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Carragher B, Wilson IA, Ward AB (2013) Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342:1484-90
- MacDonald KS, Embree J, Njenga S, Nagelkerke NJ, Ngatia I, Mohammed Z, Barber BH, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Plummer FA (1998) Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* 177:551-6
- Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R (1986) The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47:333-48
- Maggi E, Mazzetti M, Ravina A, Annunziato F, de Carli M, Piccinni MP, Manetti R, Carbonari M, Pesce AM, del Prete G, et al. (1994) Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science* 265:244-8
- Maldarelli F, Kearney M, Palmer S, Stephens R, Mican J, Polis MA, Davey RT, Kovacs J, Shao W, Rock-Kress D, Metcalf JA, Rehm C, Greer SE, Lucey DL, Danley K, Alter H, Mellors JW, Coffin JM (2013) HIV populations are large and accumulate high genetic diversity in a nonlinear fashion. *J Virol* 87:10313-23
- Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR (1989) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338:254-7
- Mao Y, Wang L, Gu C, Herschhorn A, Xiang SH, Haim H, Yang X, Sodroski J (2012) Subunit organization of the membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein trimer. *Nat Struct Mol Biol* 19:893-9
- Margolis L, Shattock R (2006) Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nat Rev Microbiol* 4:312-7
- Mariani SA, Vicenzi E, Poli G (2011) Asymmetric HIV-1 co-receptor use and replication in CD4(+) T lymphocytes. *J Transl Med* 9 Suppl 1:S8
- Martin HL, Jr., Nyange PM, Richardson BA, Lavreys L, Mandaliya K, Jackson DJ, Ndinya-Achola JO, Kreiss J (1998) Hormonal contraception, sexually transmitted diseases, and risk of heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 178:1053-9
- Mascola JR, Lewis MG, Stiegler G, Harris D, VanCott TC, Hayes D, Louder MK, Brown CR, Sapan CV, Frankel SS, Lu Y, Robb ML, Katinger H, Birx DL (1999) Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol* 73:4009-18
- Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S (1981) An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *The New England journal of medicine* 305:1431-8
- Masur H, Michelis MA, Wormser GP, Lewin S, Gold J, Tapper ML, Giron J, Lerner CW, Armstrong D, Setia U, Sender JA, Siebken RS, Nicholas P, Arlen Z, Maayan S, Ernst JA, Siegal FP, Cunningham-Rundles S (1982) Opportunistic infection in previously healthy women. Initial manifestations of a community-acquired cellular immunodeficiency. *Ann Intern Med* 97:533-9
- Matt C, Roger M (2001) Genetic determinants of pediatric HIV-1 infection: vertical transmission and disease progression among children. *Mol Med* 7:583-9

- Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M (2005) Massive infection and loss of memory CD4<sup>+</sup> T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434:1093-7
- McCaffrey RA, Saunders C, Hensel M, Stamatatos L (2004) N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *J Virol* 78:3279-95
- McGovern RA, Symons J, Poon AF, Harrigan PR, van Lelyveld SF, Hoepelman AI, van Ham PM, Dong W, Wensing AM, Nijhuis M (2013) Maraviroc treatment in non-R5-HIV-1-infected patients results in the selection of extreme CXCR4-using variants with limited effect on the total viral setpoint. *J Antimicrob Chemother* 68:2007-14
- McLellan JS, Pancera M, Carrico C, Gorman J, Julien JP, Khayat R, Louder R, Pejchal R, Sastry M, Dai K, O'Dell S, Patel N, Shahzad-ul-Hussan S, Yang Y, Zhang B, Zhou T, Zhu J, Boyington JC, Chuang GY, Diwanji D, Georgiev I, Kwon YD, Lee D, Louder MK, Moquin S, Schmidt SD, Yang ZY, Bonsignori M, Crump JA, Kapiga SH, Sam NE, Haynes BF, Burton DR, Koff WC, Walker LM, Phogat S, Wyatt R, Orwenyo J, Wang LX, Arthos J, Bewley CA, Mascola JR, Nabel GJ, Schief WR, Ward AB, Wilson IA, Kwong PD (2011) Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* 480:336-43
- McMichael A, Klenerman P (2002) HIV/AIDS. HLA leaves its footprints on HIV. *Science* 296:1410-1
- Medina KL, Smithson G, Kincade PW (1993) Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J Exp Med* 178:1507-15
- Meier A, Chang JJ, Chan ES, Pollard RB, Sidhu HK, Kulkarni S, Wen TF, Lindsay RJ, Orellana L, Mildvan D, Bazner S, Streeck H, Alter G, Lifson JD, Carrington M, Bosch RJ, Robbins GK, Altfeld M (2009) Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat Med* 15:955-9
- Melby T, Despirito M, Demasi R, Heilek-Snyder G, Greenberg ML, Graham N (2006) HIV-1 coreceptor use in triple-class treatment-experienced patients: baseline prevalence, correlates, and relationship to enfuvirtide response. *J Infect Dis* 194:238-46
- Mikyas Y, Aziz N, Harawa N, Gorre M, Neagos N, Nogueira M, Wafer D, Dillon M, Boyer PJ, Bryson YJ, Plaeger S (1997) Immunologic activation during pregnancy: serial measurement of lymphocyte phenotype and serum activation molecules in HIV-infected and uninfected women. *J Reprod Immunol* 33:157-70
- Mild M, Gray RR, Kvist A, Lemey P, Goodenow MM, Fenyo EM, Albert J, Salemi M, Esbjornsson J, Medstrand P (2013) High inpatient HIV-1 evolutionary rate is associated with CCR5-to-CXCR4 coreceptor switch. *Infect Genet Evol* 19:369-77
- Mild M, Kvist A, Esbjornsson J, Karlsson I, Fenyo EM, Medstrand P (2010) Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection. *Infect Genet Evol* 10:356-64
- Milich L, Margolin B, Swanstrom R (1993) V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J Virol* 67:5623-34
- Miller MD, Farnet CM, Bushman FD (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71:5382-90
- Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC, Feinberg MB (1994) The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and

- replication in primary lymphocytes and macrophages. *The Journal of experimental medicine* 179:101-13
- Minkoff H, Hershow R, Watts DH, Frederick M, Cheng I, Tuomala R, Pitt J, Zorrilla CD, Hammill H, Adeniyi-Jones SK, Thompson B (2003) The relationship of pregnancy to human immunodeficiency virus disease progression. *Am J Obstet Gynecol* 189:552-9
- Mirza A, Rathore MH (2012) Pediatric HIV Infection. *Adv Pediatr* 59:9-26
- Mondor I, Ugolini S, Sattentau QJ (1998) Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* 72:3623-34
- Money DM, Arikan YY, Remple V, Sherlock C, Craib K, Birch P, Burdge DR (2003) Genital tract and plasma human immunodeficiency virus viral load throughout the menstrual cycle in women who are infected with ovulatory human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol* 188:122-8
- Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, Mallal SA (2002) Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* 296:1439-43
- Moore JP, Cao Y, Ho DD, Koup RA (1994) Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 68:5142-55
- Moore PL, Gray ES, Choge IA, Ranchobe N, Mlisana K, Abdool Karim SS, Williamson C, Morris L, Team CS (2008) The c3-v4 region is a major target of autologous neutralizing antibodies in human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* 82:1860-9
- Moore PL, Ranchobe N, Lambson BE, Gray ES, Cave E, Abrahams MR, Bandawe G, Mlisana K, Abdool Karim SS, Williamson C, Morris L, Study C, Immunology NCFHAV (2009) Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in early HIV-1 subtype C infection. *PLoS Pathog* 5:e1000598
- Mor G, Cardenas I (2010) The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* 63:425-33
- Mori K, Yasutomi Y, Ohgimoto S, Nakasone T, Takamura S, Shioda T, Nagai Y (2001) Quintuple deglycosylation mutant of simian immunodeficiency virus SIVmac239 in rhesus macaques: robust primary replication, tightly contained chronic infection, and elicitation of potent immunity against the parental wild-type strain. *J Virol* 75:4023-8
- Mostad SB, Overbaugh J, DeVange DM, Welch MJ, Chohan B, Mandaliya K, Nyange P, Martin HL, Jr., Ndinya-Achola J, Bwayo JJ, Kreiss JK (1997) Hormonal contraception, vitamin A deficiency, and other risk factors for shedding of HIV-1 infected cells from the cervix and vagina. *Lancet* 350:922-7
- Moulard M, Phogat SK, Shu Y, Labrijn AF, Xiao X, Binley JM, Zhang MY, Sidorov IA, Broder CC, Robinson J, Parren PW, Burton DR, Dimitrov DS (2002) Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6913-8
- Mouquet H, Klein F, Scheid JF, Warncke M, Pietzsch J, Oliveira TY, Velinzon K, Seaman MS, Nussenzweig MC (2011) Memory B cell antibodies to HIV-1 gp140 cloned from individuals infected with clade A and B viruses. *PLoS One* 6:e24078
- Mundy DC, Schinazi RF, Gerber AR, Nahmias AJ, Randall HW, Jr. (1987) Human immunodeficiency virus isolated from amniotic fluid. *Lancet* 2:459-60

- Munoz LD, Serramia MJ, Fresno M, Munoz-Fernandez MA (2007) Progesterone inhibits HIV-1 replication in human trophoblast cells through inhibition of autocrine tumor necrosis factor secretion. *J Infect Dis* 195:1294-302
- Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG (2011) Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 241:20-38
- Munoz-Valle JF, Vazquez-Del Mercado M, Garcia-Iglesias T, Orozco-Barocio G, Bernard-Medina G, Martinez-Bonilla G, Bastidas-Ramirez BE, Navarro AD, Bueno M, Martinez-Lopez E, Best-Aguilera CR, Kamachi M, Armendariz-Borunda J (2003) T(H)1/T(H)2 cytokine profile, metalloprotease-9 activity and hormonal status in pregnant rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* 131:377-84
- Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, Palese P, Katinger H (1994) Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J Virol* 68:4031-4
- Muzzio D, Zenclussen AC, Jensen F (2013) The Role of B Cells in Pregnancy: the Good and the Bad. *Am J Reprod Immunol*
- Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N, Taguchi H, Hitani A, Kawana-Tachikawa A, Fukushima M, Yamada K, Sugiura W, Oka SI, Ajisawa A, Sato H, Takebe Y, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T (2000) Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J Virol* 74:5452-9
- Narita M, Yamada S, Kikuta H, Togashi T (2000) Reconstitution of humoral immunity during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 44:148-52
- Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT (2008) Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int* 28:1190-9
- Nedellec R, Coetzer M, Shimizu N, Hoshino H, Polonis VR, Morris L, Martensson UE, Binley J, Overbaugh J, Mosier DE (2009) Virus entry via the alternative coreceptors CCR3 and FPRL1 differs by human immunodeficiency virus type 1 subtype. *J Virol* 83:8353-63
- Neel C, Etienne L, Li Y, Takehisa J, Rudicell RS, Bass IN, Moudindo J, Mebenga A, Esteban A, Van Heuverswyn F, Liegeois F, Kranzusch PJ, Walsh PD, Sanz CM, Morgan DB, Ndjanga JB, Plantier JC, Locatelli S, Gonder MK, Leendertz FH, Boesch C, Todd A, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Hahn BH, Peeters M (2010) Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in wild-living gorillas. *J Virol* 84:1464-76
- Nei M, Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3:418-26
- Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425-30
- Nermut MV, Fassati A (2003) Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes. *J Virol* 77:8196-206
- Newell ML, Dunn DT, Peckham CS, Semprini AE, Pardi G (1996) Vertical transmission of HIV-1: maternal immune status and obstetric factors. The European Collaborative Study. *AIDS* 10:1675-81
- Nguyen RH, Wilcox AJ (2005) Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms. *J Epidemiol Community Health* 59:1019-21



- Ntrivalas EI, Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, Ng SC, Beaman KD, Mantouvalos HP, Beer AE (2001) Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod* 16:855-61
- Nygren KG, Johansson ED, Wide L (1973) Evaluation of the prognosis of threatened abortion from the peripheral plasma levels of progesterone, estradiol, and human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol* 116:916-22
- Ogert RA, Lee MK, Ross W, Buckler-White A, Martin MA, Cho MW (2001) N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* 75:5998-6006
- Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ (1998) Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279:2103-6
- Ometto L, Zanchetta M, Mainardi M, De Salvo GL, Garcia-Rodriguez MC, Gray L, Newell ML, Chieco-Bianchi L, De Rossi A (2000) Co-receptor usage of HIV-1 primary isolates, viral burden, and CCR5 genotype in mother-to-child HIV-1 transmission. *AIDS* 14:1721-9
- OMS (2011) Global Health Observatory (GHO). <http://www.who.int/gho/hiv/en/index.html>
- Ono A (2010) Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biol Cell* 102:335-50
- ONUSIDA (2014) The gap report.
- Ott DE (2008) Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev Med Virol* 18:159-75
- Overbaugh J, Morris L (2012) The Antibody Response against HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a007039
- Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338:853-60
- Palella Jr FJ, Chmiel JS, Moorman AC, Holmberg SD (2002) Durability and predictors of success of highly active antiretroviral therapy for ambulatory HIV-infected patients. *AIDS* 16:1617-26
- Pancera M (2005) Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodeficiency humaine de type 1 (VIH1). *Virologie* 9:457-472
- Pancera M, Majeed S, Ban YE, Chen L, Huang CC, Kong L, Kwon YD, Stuckey J, Zhou T, Robinson JE, Schief WR, Sodroski J, Wyatt R, Kwong PD (2010) Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1166-71
- Pantaleo G, Fauci AS (1996) Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 50:825-54
- Papandreou MJ, Idziorek T, Miquelis R, Fenouillet E (1996) Glycosylation and stability of mature HIV envelope glycoprotein conformation under various conditions. *FEBS Lett* 379:171-6

- Paquette JS, Fortin JF, Blanchard L, Tremblay MJ (1998) Level of ICAM-1 surface expression on virus producer cells influences both the amount of virion-bound host ICAM-1 and human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* 72:9329-36
- Parren PW, Burton DR, Sattentau QJ (1997a) HIV-1 antibody--debris or virion? *Nat Med* 3:366-7
- Parren PW, Gauduin MC, Koup RA, Poignard P, Fiscaro P, Burton DR, Sattentau QJ (1997b) Relevance of the antibody response against human immunodeficiency virus type 1 envelope to vaccine design. *Immunol Lett* 57:105-12
- Pastore C, Nedellec R, Ramos A, Pontow S, Ratner L, Mosier DE (2006) Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations. *J Virol* 80:750-8
- Pastore C, Ramos A, Mosier DE (2004) Intrinsic obstacles to human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching. *J Virol* 78:7565-74
- Pazos M, Sperling RS, Moran TM, Kraus TA (2012) The influence of pregnancy on systemic immunity. *Immunol Res*
- Pepe G, Albrecht E (2008) Steroid Endocrinology of pregnancy. *Glob. libr. women's med.*
- Pepin J (2011) The Origin of AIDS.
- Perdomo MF, Levi M, Sallberg M, Vahlne A (2008) Neutralization of HIV-1 by redirection of natural antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12515-20
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271:1582-6
- Pessoa R, Carneiro Proietti AB, Busch MP, Sanabani SS (2014) Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF72\_BF1) in Deep Sequencing Data from Blood Donors in Southeastern Brazil. *Genome Announc* 2
- Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM (2005) Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* 97:107-13
- Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, et al. (1991) Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 354:453-9
- Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S (2000a) Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem Soc Trans* 28:212-5
- Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S (2000b) Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol* 109:30-3
- Pierdominici M, Maselli A, Colasanti T, Giammarioli AM, Delunardo F, Vacirca D, Sanchez M, Giovannetti A, Malorni W, Ortona E (2010) Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. *Immunol Lett* 132:79-85
- Pinter A, Honnen WJ, He Y, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Kayman SC (2004) The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J Virol* 78:5205-15
- Plantier JC, Leme V, Dorval I, Gueudin M, Braun J, Hutin P, Ruffault A, Simon F (2004) HIV-1 group M superinfection in an HIV-1 group O-infected patient. *AIDS* 18:2444-6

- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Leme V, Damond F, Robertson DL, Simon F (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15:871-2
- Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alizon M (1997) Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* 276:1874-8
- Poignard P, Saphire EO, Parren PW, Burton DR (2001) gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol* 19:253-74
- Poles MA, Elliott J, Taing P, Anton PA, Chen IS (2001) A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 75:8390-9
- Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA (2001) N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* 276:13433-41
- Pollakis G, Paxton WA (2012) Use of (alternative) coreceptors for HIV entry. *Curr Opin HIV AIDS* 7:440-9
- Pollara J, Bonsignori M, Moody MA, Pazgier M, Haynes BF, Ferrari G (2013) Epitope specificity of human immunodeficiency virus-1 antibody dependent cellular cytotoxicity [ADCC] responses. *Curr HIV Res* 11:378-87
- Popovic M, Sarnagadharan MG, Read E, Gallo RC (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500
- Prakash M, Kapembwa MS, Gotch F, Patterson S (2002) Oral contraceptive use induces upregulation of the CCR5 chemokine receptor on CD4(+) T cells in the cervical epithelium of healthy women. *J Reprod Immunol* 54:117-31
- Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, Bangham CR, Phillips RE (1997) Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1890-5
- Purcell DF, Martin MA (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* 67:6365-78
- Quagliarello V (1982) The Acquired Immunodeficiency Syndrome: current status. *Yale J Biol Med* 55:443-52
- Quillent C, Oberlin E, Braun J, Rousset D, Gonzalez-Canali G, Metais P, Montagnier L, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Beretta A (1998) HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 351:14-8
- Rademeyer C, Moore PL, Taylor N, Martin DP, Choge IA, Gray ES, Sheppard HW, Gray C, Morris L, Williamson C (2007) Genetic characteristics of HIV-1 subtype C envelopes inducing cross-neutralizing antibodies. *Virology* 368:172-81
- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E (1999) Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 196:122-30

- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R (2000) Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 15:713-8
- Rambaut A, Robertson DL, Pybus OG, Peeters M, Holmes EC (2001) Human immunodeficiency virus. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature* 410:1047-8
- Ransy DG, Akouamba BS, Samson J, Lapointe N, Soudeyns H (2007) [Maternal immunity and mother-to-child transmission of HCV and HIV-1: challenges and recent advances]. *Med Sci (Paris)* 23:991-6
- Ransy DG, Motorina A, Merindol N, Akouamba BS, Samson J, Lie Y, Napolitano LA, Lapointe N, Boucher M, Soudeyns H (2014) Evolution of HIV-1 coreceptor usage and coreceptor switching during pregnancy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 30:312-24
- Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF (1996) Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 271:17161-6
- Ravichandran KS, Collins TL, Burakoff SJ (1996) CD4 and signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol* 205:47-62
- Raymond S, Delobel P, Izopet J (2012) Phenotyping methods for determining HIV tropism and applications in clinical settings. *Curr Opin HIV AIDS* 7:463-9
- Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, Encinas S, Bruel P, Sandres-Saune K, Marchou B, Massip P, Izopet J (2010a) Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage. *J Clin Virol* 47:126-30
- Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, Sandres-Saune K, Cuzin L, Marchou B, Massip P, Izopet J (2008) Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* 22:F11-6
- Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Ferradini L, Cazabat M, Souyris C, Sandres-Saune K, Pasquier C, Marchou B, Massip P, Izopet J (2010b) Prediction of HIV type 1 subtype C tropism by genotypic algorithms built from subtype B viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 53:167-75
- Re F, Braaten D, Franke EK, Luban J (1995) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *Journal of virology* 69:6859-64
- Regoes RR, Bonhoeffer S (2005) The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol* 13:269-77
- Repits J, Oberg M, Esbjornsson J, Medstrand P, Karlsson A, Albert J, Fenyo EM, Jansson M (2005) Selection of human immunodeficiency virus type 1 R5 variants with augmented replicative capacity and reduced sensitivity to entry inhibitors during severe immunodeficiency. *J Gen Virol* 86:2859-69
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prensri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361:2209-20

- Resch W, Hoffman N, Swanstrom R (2001) Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology* 288:51-62
- Rich KC, Siegel JN, Jennings C, Rydman RJ, Landay AL (1999) CD8+ lymphocytes in pregnancy and HIV infection: characterization of CD8+ subpopulations and CD8+ noncytotoxic antiviral activity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:665-70
- Richardson K, Weinberg A (2011) Dynamics of regulatory T-cells during pregnancy: effect of HIV infection and correlations with other immune parameters. *PLoS One* 6:e28172
- Richman DD, Bozzette SA (1994) The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 169:968-74
- Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ (2003) Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4144-9
- Rizzuto C, Sodroski J (2000) Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:741-9
- Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J (1998) A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280:1949-53
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B (2000) HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288:55-6
- Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH (1995) Recombination in HIV-1. *Nature* 374:124-6
- Rogel ME, Wu LI, Emerman M (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *Journal of virology* 69:882-8
- Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW (2007) Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis* 7:105-17
- Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK (2006) Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 11:317-26
- Rong R, Bibollet-Ruche F, Mulenga J, Allen S, Blackwell JL, Derdeyn CA (2007) Role of V1V2 and other human immunodeficiency virus type 1 envelope domains in resistance to autologous neutralization during clade C infection. *J Virol* 81:1350-9
- Rong R, Li B, Lynch RM, Haaland RE, Murphy MK, Mulenga J, Allen SA, Pinter A, Shaw GM, Hunter E, Robinson JE, Gnanakaran S, Derdeyn CA (2009) Escape from autologous neutralizing antibodies in acute/early subtype C HIV-1 infection requires multiple pathways. *PLoS Pathog* 5:e1000594
- Ronsmans C, Khlal M, Kodio B, Ba M, De Bernis L, Etard J (2001) Evidence for a 'healthy pregnant woman effect' in Niakhar, Senegal? *Int J Epidemiol* 30:467-73; discussion 474-5
- Ross HA, Rodrigo AG (2002a) Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J Virol* 76:11715-20

- Ross HA, Rodrigo AG (2002b) Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *Journal of virology* 76:11715-20
- Rozenbaum W, Coulaud JP, Saimot AG, Klatzmann D, Mayaud C, Carette MF (1982) Multiple opportunistic infection in a male homosexual in France. *Lancet* 1:572-3
- Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseltine WA, Rosen CA (1989) Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *Journal of virology* 63:1-8
- Rusconi S, Moonis M, Merrill DP, Pallai PV, Neidhardt EA, Singh SK, Willis KJ, Osburne MS, Profy AT, Jenson JC, Hirsch MS (1996) Naphthalene sulfonate polymers with CD4-blocking and anti-human immunodeficiency virus type 1 activities. *Antimicrob Agents Chemother* 40:234-6
- Sachdeva N, Oshima K, Cotter A, Ashman M, Davila L, Okazaki T, Inaba N, Asthana D (2008) Analysis of immunological markers associated with pregnancy and HIV-1 infection: relevance in perinatal transmission in HIV-1-infected pregnant women with low plasma viral load. *Am J Reprod Immunol* 60:264-73
- Safrit JT, Andrews CA, Zhu T, Ho DD, Koup RA (1994) Characterization of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope. *J Exp Med* 179:463-72
- Sagar M, Wu X, Lee S, Overbaugh J (2006) Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J Virol* 80:9586-98
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR (1998a) Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19:568-74
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A (1998b) Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187:875-83
- Salvatori F, Scarlatti G (2001) HIV type 1 chemokine receptor usage in mother-to-child transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:925-35
- Salzwedel K, Berger EA (2000) Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12794-9
- Sanchez-Palomino S, Rojas JM, Martinez MA, Fenyo EM, Najera R, Domingo E, Lopez-Galindez C (1993) Dilute passage promotes expression of genetic and phenotypic variants of human immunodeficiency virus type 1 in cell culture. *J Virol* 67:2938-43
- Sander O, Sing T, Sommer I, Low AJ, Cheung PK, Harrigan PR, Lengauer T, Domingues FS (2007) Structural descriptors of gp120 V3 loop for the prediction of HIV-1 coreceptor usage. *PLoS Comput Biol* 3:e58
- Sanders RW, Venturi M, Schiffner L, Kalyanaraman R, Katinger H, Lloyd KO, Kwong PD, Moore JP (2002) The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* 76:7293-305
- Saracino A, Monno L, Cibelli DC, Punzi G, Brindicci G, Ladisa N, Tartaglia A, Lagioia A, Angarano G (2009) Co-receptor switch during HAART is independent of virological success. *J Med Virol* 81:2036-44

- Sather DN, Carbonetti S, Malherbe DC, Pissani F, Stuart AB, Hessel AJ, Gray MD, Mikell I, Kalams SA, Haigwood NL, Stamatatos L (2014) Emergence of broadly neutralizing antibodies and viral coevolution in two subjects during the early stages of infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 88:12968-81
- Sattentau QJ, Clapham PR, Weiss RA, Beverley PC, Montagnier L, Alhalabi MF, Gluckmann JC, Klatzmann D (1988) The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *AIDS* 2:101-5
- Scarlatti G, Hodara V, Rossi P, Muggiasca L, Buccheri A, Albert J, Fenyo EM (1993) Transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from mother to child correlates with viral phenotype. *Virology* 197:624-9
- Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, Malnati MS, Plebani A, Siccardi AG, Littman DR, Fenyo EM, Lusso P (1997) In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 3:1259-65
- Schacker T, Coombs RW, Collier AC, Zeh JE, Fox I, Alam J, Nelson K, Eggert E, Corey L (1994) The effects of high-dose recombinant soluble CD4 on human immunodeficiency virus type 1 viremia. *J Infect Dis* 169:37-40
- Schuchat A, Deaver KA, Wenger JD, Plikaytis BD, Mascola L, Pinner RW, Reingold AL, Broome CV (1992) Role of foods in sporadic listeriosis. I. Case-control study of dietary risk factors. The Listeria Study Group. *JAMA* 267:2041-5
- Schuitmaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M (1992) Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 66:1354-60
- Schuitmaker H, van 't Wout AB, Lusso P (2011) Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *J Transl Med* 9 Suppl 1:S5
- Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2:338-42
- Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM, Pavlakis GN (1989) Rapidly and slowly replicating human immunodeficiency virus type 1 isolates can be distinguished according to target-cell tropism in T-cell and monocyte cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7200-3
- Sede MM, Moretti FA, Laufer NL, Jones LR, Quarleri JF (2014) HIV-1 tropism dynamics and phylogenetic analysis from longitudinal ultra-deep sequencing data of CCR5- and CXCR4-using variants. *PLoS One* 9:e102857
- Sharon M, Kessler N, Levy R, Zolla-Pazner S, Gorlach M, Anglister J (2003) Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic beta hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure* 11:225-36
- Sharp PM, Hahn BH (2010) The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:2487-94
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646-50
- Sheffield JS, Wendel GD, Jr., McIntire DD, Norgard MV (2009) The effect of progesterone levels and pregnancy on HIV-1 coreceptor expression. *Reprod Sci* 16:20-31

- Sheppard HW, Celum C, Michael NL, O'Brien S, Dean M, Carrington M, Dondero D, Buchbinder SP (2002) HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29:307-13
- Shimizu N, Tanaka A, Oue A, Mori T, Ohtsuki T, Apichartpiyakul C, Uchiumi H, Nojima Y, Hoshino H (2009) Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates of HIV. *AIDS* 23:761-9
- Shozu M, Akasofu K, Harada T, Kubota Y (1991) A new cause of female pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 72:560-6
- Shriner D, Shankarappa R, Jensen MA, Nickle DC, Mittler JE, Margolick JB, Mullins JI (2004) Influence of random genetic drift on human immunodeficiency virus type 1 env evolution during chronic infection. *Genetics* 166:1155-64
- Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR, et al. (1981) Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *The New England journal of medicine* 305:1439-44
- Sierra-Enguita R, Rodriguez C, Aguilera A, Gutierrez F, Eiros JM, Caballero E, Lapaz M, Soriano V, del Romero J, de Mendoza C, Spanish HIVSSG (2014) X4 tropic viruses are on the rise in recent HIV-1 seroconverters in Spain. *AIDS* 28:1603-9
- Simister NE (2003) Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21:3365-9
- Simmons G, Reeves JD, Hibbitts S, Stine JT, Gray PW, Proudfoot AE, Clapham PR (2000) Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. *Immunol Rev* 177:112-26
- Simon F, Mauclere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F (1998) Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 4:1032-7
- Sing T, Low AJ, Beerenwinkel N, Sander O, Cheung PK, Domingues FS, Buch J, Daumer M, Kaiser R, Lengauer T, Harrigan PR (2007) Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antivir Ther* 12:1097-106
- Singh A, Page T, Moore PL, Allgaier RL, Hiramani K, Coovadia HM, Walker BD, Morris L, Ndung'u T (2009) Functional and genetic analysis of coreceptor usage by dualtropic HIV-1 subtype C isolates. *Virology* 393:56-67
- Sirois S, Touaibia M, Chou KC, Roy R (2007) Glycosylation of HIV-1 gp120 V3 loop: towards the rational design of a synthetic carbohydrate vaccine. *Curr Med Chem* 14:3232-42
- Skoler-Karpoff S, Ramjee G, Ahmed K, Altini L, Plagianos MG, Friedland B, Govender S, De Kock A, Cassim N, Palanee T, Dozier G, Maguire R, Lahteenmaki P (2008) Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372:1977-87
- Snoeck J, Fellay J, Bartha I, Douek DC, Telenti A (2011) Mapping of positive selection sites in the HIV-1 genome in the context of RNA and protein structural constraints. *Retrovirology* 8:87
- Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT (2004) Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 112:38-43



- Soudeyns H, Paolucci S, Chappey C, Daucher MB, Graziosi C, Vaccarezza M, Cohen OJ, Fauci AS, Pantaleo G (1999) Selective pressure exerted by immunodominant HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses during primary infection drives genetic variation restricted to the cognate epitope. *Eur J Immunol* 29:3629-35
- Spector TD, Da Silva JA (1992) Pregnancy and rheumatoid arthritis: an overview. *Am J Reprod Immunol* 28:222-5
- Sprecher S, Soumenkoff G, Puissant F, Degueldre M (1986) Vertical transmission of HIV in 15-week fetus. *Lancet* 2:288-9
- Stehr-Green JK, Holman RC, Jason JM, Evatt BL (1988) Hemophilia-associated AIDS in the United States, 1981 to September 1987. *American journal of public health* 78:439-42
- Sterling TR, Lyles CM, Vlahov D, Astemborski J, Margolick JB, Quinn TC (1999) Sex differences in longitudinal human immunodeficiency virus type 1 RNA levels among seroconverters. *J Infect Dis* 180:666-72
- Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Voglauer R, Steindl F, Katinger H (2001) A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1757-65
- Stoneburner RL, Des Jarlais DC, Benezra D, Gorelkin L, Sotheran JL, Friedman SR, Schultz S, Marmor M, Mildvan D, Maslansky R (1988) A larger spectrum of severe HIV-1--related disease in intravenous drug users in New York City. *Science* 242:916-9
- Straub RH (2007) The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 28:521-74
- Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA (1987) The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 328:728-30
- Strunnikova N, Ray SC, Lancioni C, Nguyen M, Viscidi RP (1998) Evolution of human immunodeficiency virus type 1 in relation to disease progression in children. *J Hum Virol* 1:224-39
- Strunnikova N, Ray SC, Livingston RA, Rubalcaba E, Viscidi RP (1995) Convergent evolution within the V3 loop domain of human immunodeficiency virus type 1 in association with disease progression. *J Virol* 69:7548-58
- Su Z, Gulick RM, Krambrink A, Coakley E, Hughes MD, Han D, Flexner C, Wilkin TJ, Skolnik PR, Greaves WL, Kuritzkes DR, Reeves JD (2009) Response to vicriviroc in treatment-experienced subjects, as determined by an enhanced-sensitivity coreceptor tropism assay: reanalysis of AIDS clinical trials group A5211. *J Infect Dis* 200:1724-8
- Svicher V, Cento V, Rozera G, Abbate I, Santoro MM, Armenia D, Fabeni L, Bruselles A, Latini A, Palamara G, Micheli V, Rizzardini G, Gori C, Forbici F, Ippolito G, Andreoni M, Antinori A, Ceccherini-Silberstein F, Capobianchi MR, Perno CF (2013) The genotypic false positive rate determined by V3 population sequencing can predict the burden of HIV-1 CXCR4-using species detected by pyrosequencing. *PLoS One* 8:e53603
- Tai JH, Udoji MA, Barkanic G, Byrne DW, Rebeiro PF, Byram BR, Kheshti A, Carter JD, Graves CR, Raffanti SP, Sterling TR (2007) Pregnancy and HIV disease progression during the era of highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 196:1044-52
- Tallon DF, Corcoran DJ, O'Dwyer EM, Grealley JF (1984) Circulating lymphocyte subpopulations in pregnancy: a longitudinal study. *J Immunol* 132:1784-7
- Tamm LK, Han X (2000) Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes. *Biosci Rep* 20:501-18

- Tanaka Y, Koyanagi Y, Tanaka R, Kumazawa Y, Nishimura T, Yamamoto N (1997) Productive and lytic infection of human CD4+ type 1 helper T cells with macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71:465-70
- Tasca S, Zhuang K, Gettie A, Knight H, Blanchard J, Westmoreland S, Cheng-Mayer C (2011) Effect of B-cell depletion on coreceptor switching in R5 simian-human immunodeficiency virus infection of rhesus macaques. *J Virol* 85:3086-94
- Tauscher AE, Fleischer AB, Jr., Phelps KC, Feldman SR (2002) Psoriasis and pregnancy. *J Cutan Med Surg* 6:561-70
- Tebit DM, Arts EJ (2011) Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect Dis* 11:45-56
- Tersmette M, de Goede RE, Al BJ, Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT, Huisman HG, Miedema F (1988) Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 62:2026-32
- Thielen A, Sichtig N, Kaiser R, Lam J, Harrigan PR, Lengauer T (2010) Improved prediction of HIV-1 coreceptor usage with sequence information from the second hypervariable loop of gp120. *J Infect Dis* 202:1435-43
- Thiry L, Sprecher-Goldberger S, Jonckheer T, Levy J, Van de Perre P, Henrivaux P, Cogniaux-LeClerc J, Clumeck N (1985) Isolation of AIDS virus from cell-free breast milk of three healthy virus carriers. *Lancet* 2:891-2
- Thomas PA, Weedon J, Krasinski K, Abrams E, Shaffer N, Matheson P, Bamji M, Kaul A, Hutson D, Grimm KT, et al. (1994) Maternal predictors of perinatal human immunodeficiency virus transmission. The New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *Pediatr Infect Dis J* 13:489-95
- Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, Montaner JS, Rizzardini G, Telenti A, Gatell JM, Gunthard HF, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Reiss P, Richman DD, Volberding PA, Yeni P, Schooley RT (2010) Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 304:321-33
- Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, Decamp AC, Parks RJ, Ashley VC, Lucas JT, Cohen M, Eron J, Hicks CB, Liao HX, Self SG, Landucci G, Forthal DN, Weinhold KJ, Keele BF, Hahn BH, Greenberg ML, Morris L, Karim SS, Blattner WA, Montefiori DC, Shaw GM, Perelson AS, Haynes BF (2008) Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* 82:12449-63
- Torres Y, Medrano FJ, Rey C, Calderon EJ, Sanchez-Quijano A, Lissen E, Leal M (1998) Evidence for a role of T-helper type 2 cytokines in the acquisition of human immunodeficiency virus syncytium-inducing phenotype. *Eur J Clin Invest* 28:930-6
- Tranchot-Diallo J, Gras G, Parnet-Mathieu F, Benveniste O, Marce D, Roques P, Milliez J, Chaouat G, Dormont D (1997) Modulations of cytokine expression in pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 37:215-26
- Trkola A, Purtscher M, Muster T, Ballaun C, Buchacher A, Sullivan N, Srinivasan K, Sodroski J, Moore JP, Katinger H (1996) Human monoclonal antibody 2G12 defines a

- distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70:1100-8
- Troesch M, Jalbert E, Canobio S, Boulassel MR, Routy JP, Bernard NF, Bruneau J, Lapointe N, Boucher M, Soudeyns H (2005) Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* 19:775-84
- Trunova N, Tsai L, Tung S, Schneider E, Harouse J, Gettie A, Simon V, Blanchard J, Cheng-Mayer C (2006) Progestin-based contraceptive suppresses cellular immune responses in SHIV-infected rhesus macaques. *Virology* 352:169-77
- Tscherning-Casper C, Vodros D, Menu E, Aperia K, Fredriksson R, Dolcini G, Chaouat G, Barre-Sinoussi F, Albert J, Fenyo EM (2000) Coreceptor usage of HIV-1 isolates representing different genetic subtypes obtained from pregnant Cameroonian women. European Network for In Utero Transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 24:1-9
- Turner BG, Summers MF (1999) Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285:1-32
- Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A, Pavlakis GN (1998) Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8886-91
- van 't Wout AB, Blaak H, Ran LJ, Brouwer M, Kuiken C, Schuitemaker H (1998) Evolution of syncytium-inducing and non-syncytium-inducing biological virus clones in relation to replication kinetics during the course of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 72:5099-107
- Van Damme L, Govinden R, Mirembe FM, Guedou F, Solomon S, Becker ML, Pradeep BS, Krishnan AK, Alary M, Pande B, Ramjee G, Deese J, Crucitti T, Taylor D (2008) Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N Engl J Med* 359:463-72
- van den Kerkhof TL, Feenstra KA, Euler Z, van Gils MJ, Rijdsdijk LW, Boeser-Nunnink BD, Heringa J, Schuitemaker H, Sanders RW (2013) HIV-1 envelope glycoprotein signatures that correlate with the development of cross-reactive neutralizing activity. *Retrovirology* 10:102
- van Gils MJ, Bunnik EM, Boeser-Nunnink BD, Burger JA, Terlouw-Klein M, Verwer N, Schuitemaker H (2011a) Longer V1V2 region with increased number of potential N-linked glycosylation sites in the HIV-1 envelope glycoprotein protects against HIV-specific neutralizing antibodies. *J Virol* 85:6986-95
- van Gils MJ, Edo-Matas D, Bowles EJ, Burger JA, Stewart-Jones GB, Schuitemaker H (2011b) Evolution of human immunodeficiency virus type 1 in a patient with cross-reactive neutralizing activity in serum. *J Virol* 85:8443-8
- van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, Albrecht-van Lent N, Scherpbier HJ, Veenstra J, Boer K, Coutinho RA, Miedema F, Schuitemaker H (1994) Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J Clin Invest* 94:2060-7
- Vazquez-Salat N, Yuhki N, Beck T, O'Brien SJ, Murphy WJ (2007) Gene conversion between mammalian CCR2 and CCR5 chemokine receptor genes: a potential mechanism for receptor dimerization. *Genomics* 90:213-24

- Veazey RS, Mansfield KG, Tham IC, Carville AC, Shvetz DE, Forand AE, Lackner AA (2000) Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 74:11001-7
- Veillette M, Desormeaux A, Medjahed H, Gharsallah NE, Coutu M, Baalwa J, Guan Y, Lewis G, Ferrari G, Hahn BH, Haynes BF, Robinson JE, Kaufmann DE, Bonsignori M, Sodroski J, Finzi A (2014) Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol* 88:2633-44
- Vermeire K, Brouwers J, Van Herrewege Y, Le Grand R, Vanham G, Augustijns P, Bell TW, Schols D (2008) CADA, a potential anti-HIV microbicide that specifically targets the cellular CD4 receptor. *Curr HIV Res* 6:246-56
- Vilaseca J, Arnau JM, Bacardi R, Mieras C, Serrano A, Navarro C (1982) Kaposi's sarcoma and toxoplasma gondii brain abscess in a Spanish homosexual. *Lancet* 1:572
- Vollenweider F, Benjannet S, Decroly E, Savaria D, Lazure C, Thomas G, Chretien M, Seidah NG (1996) Comparative cellular processing of the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein gp160 by the mammalian subtilisin/kexin-like convertases. *Biochem J* 314 ( Pt 2):521-32
- Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40:9-17
- Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien JP, Wang SK, Ramos A, Chan-Hui PY, Moyle M, Mitcham JL, Hammond PW, Olsen OA, Phung P, Fling S, Wong CH, Phogat S, Wrin T, Simek MD, Protocol GPI, Koff WC, Wilson IA, Burton DR, Poignard P (2011) Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477:466-70
- Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, Wrin T, Simek MD, Fling S, Mitcham JL, Lehrman JK, Priddy FH, Olsen OA, Frey SM, Hammond PW, Kaminsky S, Zamb T, Moyle M, Koff WC, Poignard P, Burton DR (2009) Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326:285-9
- Wang LX (2006) Toward oligosaccharide- and glycopeptide-based HIV vaccines. *Curr Opin Drug Discov Devel* 9:194-206
- Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, Amino N (1997) Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 37:368-77
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14:353-6
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM (2003) Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422:307-12
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117-22
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387:426-30

- Welch BD, VanDemark AP, Heroux A, Hill CP, Kay MS (2007) Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16828-33
- Wertheim JO, Worobey M (2009) Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Comput Biol* 5:e1000377
- Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, Jenkins TM, Perros M, van der Ryst E (2006) Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* 80:4909-20
- Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, Dorr P, Ciaramella G, Perros M (2007) Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J Virol* 81:2359-71
- Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, Chappey C, Kiss LD, Paxinos EE, Petropoulos CJ (2007) Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother* 51:566-75
- Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T (2006) Protective effects of IL4-589T and RANTES-28G on HIV-1 disease progression in infected Thai females. *AIDS* 20:189-96
- Wilczynski JR (2005) Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 122:136-43
- Wild C, Oas T, McDanal C, Bolognesi D, Matthews T (1992) A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10537-41
- Wilén CB, Tilton JC, Doms RW (2012) Molecular mechanisms of HIV entry. *Adv Exp Med Biol* 726:223-42
- Willberg CB, Garrison KE, Jones RB, Meiklejohn DJ, Spotts G, Liegler TJ, Ostrowski MA, Karlsson AC, Hecht FM, Nixon DF (2010) Rapid progressing allele HLA-B35 Px restricted anti-HIV-1 CD8+ T cells recognize vestigial CTL epitopes. *PLoS One* 5:e10249
- Wiley RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 66:7193-200
- Williamson S (2003) Adaptation in the env gene of HIV-1 and evolutionary theories of disease progression. *Mol Biol Evol* 20:1318-25
- Willumsen JF, Filteau SM, Coutsooudis A, Uebel KE, Newell ML, Tomkins AM (2000) Subclinical mastitis as a risk factor for mother-infant HIV transmission. *Adv Exp Med Biol* 478:211-23
- Wilson R, Maclean MA, Jenkins C, Kinnane D, Mooney J, Walker JJ (2001) Abnormal immunoglobulin subclass patterns in women with a history of recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 76:915-7
- Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ, Whetsell AJ, Furtado MR, Cao Y, Ho DD, Safrit JT (1996) Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 272:537-42

- Wolk T, Schreiber M (2006) N-Glycans in the gp120 V1/V2 domain of the HIV-1 strain NL4-3 are indispensable for viral infectivity and resistance against antibody neutralization. *Med Microbiol Immunol* 195:165-72
- Wong SF, Chow KM, de Swiet M (2003) Severe Acute Respiratory Syndrome and pregnancy. *BJOG* 110:641-2
- Woo J, Robertson DL, Lovell SC (2010) Constraints on HIV-1 diversity from protein structure. *J Virol* 84:12995-3003
- Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, Muyembe JJ, Kabongo JM, Kalengayi RM, Van Marck E, Gilbert MT, Wolinsky SM (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455:661-4
- Wu L, LaRosa G, Kassam N, Gordon CJ, Heath H, Ruffing N, Chen H, Humblias J, Samson M, Parmentier M, Moore JP, Mackay CR (1997) Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *J Exp Med* 186:1373-81
- Wu X, Wang C, O'Dell S, Li Y, Keele BF, Yang Z, Imamichi H, Doria-Rose N, Hoxie JA, Connors M, Shaw GM, Wyatt RT, Mascola JR (2012) Selection pressure on HIV-1 envelope by broadly neutralizing antibodies to the conserved CD4-binding site. *J Virol* 86:5844-56
- Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG (1998) The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393:705-11
- Wyatt R, Sodroski J (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-8
- Xu S, Huang X, Xu H, Zhang C (2007) Improved prediction of coreceptor usage and phenotype of HIV-1 based on combined features of V3 loop sequence using random forest. *J Microbiol* 45:441-6
- Yang OO, Sarkis PT, Ali A, Harlow JD, Brander C, Kalams SA, Walker BD (2003) Determinant of HIV-1 mutational escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 197:1365-75
- Yang P, Ai LS, Huang SC, Li HF, Chan WE, Chang CW, Ko CY, Chen SS (2010) The cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 harbors lipid raft association determinants. *J Virol* 84:59-75
- Yao XJ, Subbramanian RA, Rougeau N, Boisvert F, Bergeron D, Cohen EA (1995) Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol* 69:7032-44
- Yen PJ, Herschhorn A, Haim H, Salas I, Gu C, Sodroski J, Gabuzda D (2014) Loss of a conserved N-linked glycosylation site in the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein V2 region enhances macrophage tropism by increasing CD4-independent cell-to-cell transmission. *J Virol* 88:5014-28
- Yi Y, Isaacs SN, Williams DA, Frank I, Schols D, De Clercq E, Kolson DL, Collman RG (1999) Role of CXCR4 in cell-cell fusion and infection of monocyte-derived macrophages by primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains: two distinct mechanisms of HIV-1 dual tropism. *J Virol* 73:7117-25

- Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302:1056-60
- Yu XF, Wang Z, Beyrer C, Celentano DD, Khamboonruang C, Allen E, Nelson K (1995) Phenotypic and genotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 from patients with AIDS in northern Thailand. *J Virol* 69:4649-55
- Yusim K, Kesmir C, Gaschen B, Addo MM, Altfeld M, Brunak S, Chigaev A, Detours V, Korber BT (2002) Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation. *Journal of virology* 76:8757-68
- Zaba B, Calvert C, Marston M, Isingo R, Nakiyingi-Miiri J, Lutalo T, Crampin A, Robertson L, Herbst K, Newell ML, Todd J, Byass P, Boerma T, Ronsmans C (2013) Effect of HIV infection on pregnancy-related mortality in sub-Saharan Africa: secondary analyses of pooled community-based data from the network for Analysing Longitudinal Population-based HIV/AIDS data on Africa (ALPHA). *Lancet* 381:1763-71
- Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H (1997) Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 3:1369-75
- Zamarchi R, Allavena P, Borsetti A, Stievano L, Tosello V, Marcato N, Esposito G, Roni V, Paganin C, Bianchi G, Titti F, Verani P, Gerosa G, Amadori A (2002) Expression and functional activity of CXCR-4 and CCR-5 chemokine receptors in human thymocytes. *Clin Exp Immunol* 127:321-30
- Zapp ML, Green MR (1989) Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* 342:714-6
- Zaunders J, van Bockel D (2013) Innate and Adaptive Immunity in Long-Term Non-Progression in HIV Disease. *Front Immunol* 4:95
- Zen M, Ghirardello A, Iaccarino L, Tonon M, Campana C, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Doria A (2010) Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. *Swiss Med Wkly* 140:187-201
- Zhang H, Tully DC, Hoffmann FG, He J, Kankasa C, Wood C (2010a) Restricted genetic diversity of HIV-1 subtype C envelope glycoprotein from perinatally infected Zambian infants. *PLoS One* 5:e9294
- Zhang H, Tully DC, Zhang T, Moriyama H, Thompson J, Wood C (2010b) Molecular determinants of HIV-1 subtype C coreceptor transition from R5 to R5X4. *Virology* 407:68-79
- Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, Korber B (2004) Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* 14:1229-46
- Zhang YJ, Moore JP (1999) Will multiple coreceptors need to be targeted by inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry? *Journal of virology* 73:3443-8
- Zheng YH, Lovsin N, Peterlin BM (2005) Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunol Lett* 97:225-34

- Zhu P, Liu J, Bess J, Jr., Chertova E, Lifson JD, Grise H, Ofek GA, Taylor KA, Roux KH (2006) Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441:847-52
- Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD (1998) An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391:594-7
- Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD (1993) Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 261:1179-81
- Zhu T, Wang N, Carr A, Wolinsky S, Ho DD (1995) Evidence for coinfection by multiple strains of human immunodeficiency virus type 1 subtype B in an acute seroconverter. *J Virol* 69:1324-7
- Zhu X, Borchers C, Bienstock RJ, Tomer KB (2000) Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry* 39:11194-204
- Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, Yu H, Klarmann G, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP (2002) Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *Journal of virology* 76:11273-82
- Zhuang K, Finzi A, Tasca S, Shakirzyanova M, Knight H, Westmoreland S, Sodroski J, Cheng-Mayer C (2011) Adoption of an "open" envelope conformation facilitating CD4 binding and structural remodeling precedes coreceptor switch in R5 SHIV-infected macaques. *PLoS One* 6:e21350
- Zhuang K, Finzi A, Toma J, Frantzell A, Huang W, Sodroski J, Cheng-Mayer C (2012) Identification of interdependent variables that influence coreceptor switch in R5 SHIV(SF162P3N)-infected macaques. *Retrovirology* 9:106



**ANNEXE : ARTICLE DE REVUE**

# **IMMUNITÉ MATERNELLE ET TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH ET DU VHC: PROGRÈS RÉCENTS ET NOUVEAUX DÉFIS**

## **Maternal immunity and mother-to-child transmission of HCV and HIV-1: challenges and recent advances**

Doris G. Ransy<sup>1,2</sup>, Bertine S. Akouamba<sup>1,2</sup>, Johanne Samson<sup>3</sup>, Normand Lapointe<sup>4</sup> et Hugo Soudeyns<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup> Unité d'immunopathologie virale

<sup>2</sup> Départements de microbiologie et d'immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal (Québec), Canada

<sup>3</sup> Centre maternel et infantile sur le Sida, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal (Québec), Canada

<sup>4</sup> Département de pédiatrie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Québec, Canada

<sup>5</sup> Unité d'immunopathologie virale. Départements de microbiologie, d'immunologie et de pédiatrie, Faculté de médecine, Université de Montréal Montréal (Québec), Canada.

## **RÉSUMÉ**

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'hépatite C (VHC), deux pathogènes viraux qui provoquent et installent une infection chronique chez leur hôte, sont à l'origine de graves problèmes de santé publique à l'échelle planétaire. Le VIH et le VHC sont transmissibles de la mère à l'enfant durant la grossesse et l'accouchement, et aucun vaccin ne permet encore à l'heure actuelle de prévenir ces infections. D'importants progrès ont cependant jalonné le chemin parcouru depuis la découverte de ces virus : (1) des méthodes de dépistage et de diagnostic efficaces ont été développées ; (2) plusieurs éléments du cycle répliatif, de la pathogénie et des mécanismes de transmission ont été caractérisés ; (3) des protocoles spécifiques de prophylaxie antirétrovirale et d'immunothérapie ont été établis ; et

(4) les corrélats d'immunité sont maintenant mieux compris. Ces progrès permettent d'entrevoir le déploiement de stratégies efficaces pour prévenir la transmission mère-enfant au niveau global.

## **ABSTRACT**

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and hepatitis C virus (HCV) are two viral pathogens that establish chronic infections in their hosts and that are at present responsible for serious public health problems on a pandemic scale. HIV-1 and HCV can be transmitted from person to person by contact with bodily fluids. Both can also be transmitted from mother to child during the course of pregnancy and childbirth. There are currently no vaccines available to immunize against HIV-1 and HCV infection or to prevent mother-to-child transmission (MTCT), and accessible treatments have significant yet limited efficacy. However, important progresses have been made since the discovery of HCV and HIV-1 : (a) sensitive screening and detection methods have been perfected ; (b) risk factors for acquisition, replicative cycles, pathogenesis, and mechanisms of transmission have been better characterized ; (c) specific treatments, immunotherapy, and antiretroviral prophylaxis regimen were developed ; (d) immune correlates of protection are better understood ; and (e) vaccine design was undertaken. In addition, co-infection with HCV and HIV-1, which is common among high-risk groups including injection drug users, significantly increases the incidence of MTCT of both viruses. The mechanisms by which this facilitation occurs are still under investigation and may involve direct replicative facilitation, enhancement of placental transfer, and/or interference with host immune responses. Taken together, these developments could lead to the implementation of global scale strategies to prevent MTCT of HCV and HIV-1.

## **INTRODUCTION**

Dès le début des années 1980, quelques équipes suggéraient une possible transmission de la mère à l'enfant de l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (Sida) [1, 2]. Mais ce n'est qu'en 1985, à l'Hôpital Sainte-Justine, que le Dr Normand Lapointe et son équipe confirment pour la première fois la transmission in utero de ce virus, alors appelé

human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) [3]. Par la suite, le Centre maternel et infantile sur le Sida (CMIS), une unité hospitalière de recherche, d'enseignement et de soins sur le Sida (UHRESS), sera fondé à l'Hôpital Sainte-Justine (1988). Le CMIS deviendra la référence au Québec en matière de prévention de la transmission mère-enfant (TME) du VIH. Depuis ce temps, le HTLV-III a été rebaptisé virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et, avec près de 40 millions de personnes vivant avec le VIH à travers le monde fin 2006, l'épidémie est devenue pandémie [4]. Le virus de l'hépatite C (VHC), quant à lui, fut découvert en 1989 : sa propagation constitue toujours un problème de santé publique majeur avec près de 125 millions de personnes infectées à travers le monde [5]. Partageant la même niche épidémiologique et les mêmes voies de transmission, le VIH et le VHC affectent des populations largement chevauchantes. En effet, dans les pays développés, on estime que 25 % à 35 % de la population porteuse du VIH est co-infectée par le VHC [6].

Mécanique de la transmission mère-enfant du VIH

## **MÉCANIQUE DE LA TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH**

Il est désormais établi que le VIH peut être transmis à l'enfant en trois occasions. (1) Antepartum par passage transplacentaire [3]. Le mécanisme par lequel le VIH traverse le placenta est certes encore mal compris. La fusion/infection, la transcytose, c'est-à-dire le transport intravésiculaire du virus d'un pôle à l'autre de la cellule sans qu'il y ait d'échange avec le cytoplasme [7], ainsi que la diffusion de cellules maternelles infectées à travers des brèches dans la barrière trophoblastique [8] pourraient toutes y contribuer (Figure 1). (2) Intrapartum durant le travail et l'accouchement [9]. Les sécrétions vaginales contiennent du VIH sous forme de cellules infectées et de particules virales libres au contact desquelles l'enfant risque de s'infecter lors d'un accouchement vaginal [10], particulièrement par la voie oropharyngée [11]. (3) Postpartum dans le contexte de l'allaitement maternel [12]. La transmission lors de l'allaitement prolongé peut augmenter de près de 15 % l'incidence de la TME du VIH, et demeure problématique dans les pays en développement, où il n'est pas toujours possible de recourir à l'allaitement artificiel en raison de son coût élevé, du manque d'eau potable et des normes sociétales. Là encore, le risque de transmission par cette voie, qui

croît en fonction de la durée de l'allaitement, est associé à la présence de virus libre mais également de cellules infectées dans le lait maternel [13].

## **PRÉVENTION DE LA TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH**

Jusqu'au début des années 1990, les femmes enceintes infectées par le VIH ne recevaient aucun traitement antepartum ou intrapartum particulier visant à prévenir spécifiquement la TME du VIH. Ce n'est qu'en 1994 que l'étude PACTG076 démontra que l'administration de zidovudine (AZT ; analogue nucléosidique inhibiteur de la transcriptase inverse) à la femme enceinte et au nouveau-né réduisait de 25,5 % à 8,3 % les risques de TME du VIH chez les femmes qui n'allaitaient pas [14]. À la fin des années 1990, la thérapie antirétrovirale à haute activité (HAART) s'est progressivement imposée comme le traitement de choix des patients infectés et il est de pratique courante d'en administrer certaines combinaisons durant la grossesse [15]. La lamivudine (3TC), un antirétroviral dont l'activité anti-VIH fut mise en évidence au Québec en 1991 par l'équipe du Dr Mark Wainberg [16], est maintenant administrée en combinaison avec l'AZT. Cette combinaison, associée ou non à des inhibiteurs de protéase et utilisée de concert avec la césarienne programmée, reste encore aujourd'hui la pierre angulaire du traitement antirétroviral chez la femme enceinte dans les pays industrialisés [15]. La thérapie combinée permet de diminuer la charge virale jusqu'à des taux indétectables, de maintenir un bon niveau de cellules T CD4+, et de réduire à moins de 2 % le risque de TME [17]. En 1999, l'étude HIVNET 012 fait état de la réduction de l'incidence de la TME par un traitement simple dose à la névirapine (NVP), plus pratique et abordable que l'AZT et applicable en situation de ressources limitées [18]. La combinaison nevirapine-AZT est également efficace [19]. En Europe et en Amérique du Nord, une femme infectée non traitée a de 15 à 25 % de risques de transmettre l'infection à son enfant. Dans les régions où l'infection est endémique (Afrique et Asie), le taux de transmission passe de 25 à 40 %, élévation qui s'explique en grande partie par les différences dans la fréquence et la durée de l'allaitement maternel observées entre femmes selon les régions. Il n'en demeure pas moins qu'environ 75 % des enfants portés par une mère infectée par le VIH ne recevant pas de traitement antirétroviral ne contractent pas le VIH durant la grossesse et lors de l'accouchement, et ce en dépit de l'intimité et de la durée prolongée du contact materno-fœtal.

## **TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH ET RÉPONSE IMMUNITAIRE**

De nombreux travaux ont permis de révéler puis d'évaluer l'importance du rôle de la réponse immunitaire maternelle dans la prévention de la TME. On a observé depuis longtemps que la TME est associée à une charge virale maternelle élevée – le meilleur facteur prédictif du risque de transmission – et à un faible décompte de cellules T CD4+, deux robustes indicateurs d'immunodéficience : plus la maladie progresse, plus le décompte CD4 diminue et plus le risque de TME augmente [20]. Comparées aux mères qui ne transmettent pas le virus, les activités cytotoxiques et suppressives des lymphocytes T CD8+ anti-VIH sont réduites chez les mères qui le transmettent [21], bien que les variants VIH qui sont préférentiellement transmis à l'enfant soient ceux-là même qui échappent à la réponse cellulaire maternelle [22] et aux anticorps neutralisants [23]. On pense également que des facteurs génétiques associés à la réponse immunitaire, notamment la présence de l'allèle HLA-DR13, ainsi que la discordance entre les HLA de classe I de la mère et du fœtus protégeraient ce dernier contre la TME du VIH [24]. Enfin, des réponses T cytotoxiques [25] et des perturbations du répertoire immunitaire apparentées à des réponses antigène-spécifiques [26, 27] ont été observées chez des enfants non infectés nés de mères infectées. L'environnement de la grossesse est donc loin de représenter un vide immunitaire pour le VIH, puisqu'il doit de fait composer avec la présence « non pas de un mais bien de deux » systèmes immuns distincts, systèmes qui semblent tous deux capables de contribuer de manière significative à la résistance de l'hôte contre l'infection. Les résultats de ces études ont également amené d'influents groupes de chercheurs et de cliniciens à considérer la vaccination ou l'immunoprophylaxie (c'est-à-dire anticorps monoclonaux) comme des stratégies valables susceptibles d'endiguer la TME du VIH, particulièrement dans les situations où les ressources sont limitées et où l'on ne peut que difficilement offrir de substitut à l'allaitement maternel [28]. En effet, des études initialement prometteuses ont montré que l'immunisation passive à l'aide d'anticorps monoclonaux pouvait prévenir la TME d'un hybride des virus de l'immunodéficience simienne et humaine (SHIV) via le lait maternel chez le singe Rhesus [29]. Toutefois, plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre des déterminants du VIH de sous-type B se sont montrés

inefficaces à neutraliser des isolats de sous-type C, le sous-type dominant dans beaucoup de régions à haute endémicité [30]. L'immunoprophylaxie passive demeure néanmoins une possibilité attrayante. Il reste à déterminer son efficacité à réduire la TME sur le terrain et à développer des anticorps à large spectre pouvant être administrés seuls ou en combinaison avec des agents antirétroviraux. En collaboration avec des chercheurs de l'université Johns Hopkins et de l'université Makerere de Kampala, un essai clinique de phase I impliquant l'administration d'un vaccin canarypox recombinant exprimant certaines protéines du VIH (ALVAC-HIV ; vCP1521) a récemment été entrepris en Ouganda auprès de jeunes enfants nés de mères infectées, avec comme objectif la réduction chez ces enfants de l'incidence de la TME tardive associée à l'allaitement.

## **TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VHC**

On attribue au virus de l'hépatite C la majorité des cas d'hépatite virale chronique, avec pour suites fréquentes cirrhose et carcinome hépatique. Tout comme le VIH, le VHC se transmet de la mère à l'enfant, mais seulement dans près de 10 % des cas [31]. Après l'introduction des tests de dépistage en 1990, la TME est à toutes fins pratiques devenue l'unique source d'infection par le VHC chez l'enfant. Or, dans plusieurs pays, dont le Canada, le dépistage de l'infection au VHC durant la grossesse n'est pas universellement offert à la femme enceinte, bien que la prévalence du VHC au sein de leur population soit beaucoup plus élevée que celle du VIH ; un dépistage fondé sur la perception des facteurs de risque lui est préféré [32]. La TME du VHC diffère de celle du VIH en au moins deux points. (1) La voie de transmission in utero est plus importante dans le cas du VHC : de 30 à 50 % des cas de TME du VHC s'effectueraient par voie transplacentaire, contre une proportion de l'ordre de 20-25 % pour le VIH [33] ; et (2) bien que le VHC puisse être détecté dans le lait maternel et le colostrum à de faibles niveaux, l'allaitement maternel n'est pas considéré comme un facteur de risque de transmission du VHC à l'enfant - il ne devrait donc pas être contre-indiqué pourvu que les mamelons de la mère ne présentent aucune blessure.

## CO-INFECTION ET TME

Partageant la même niche épidémiologique, le VIH et le VHC affectent des populations largement chevauchantes. C'est ainsi que la prévalence de la co-infection VIH-VHC est particulièrement élevée chez les utilisateurs de drogues injectables (UDI). Or non seulement la TME du VIH est-elle plus fréquente chez les femmes porteuses des deux virus que chez les femmes infectées uniquement par le VIH, mais en plus, nombre d'études ont démontré qu'une telle co-infection chez la femme enceinte pouvait jusqu'à « quadrupler » le taux de transmission du VHC à l'enfant [31]. Plusieurs mécanismes pourraient potentiellement expliquer ce phénomène (Figure 1). (1) Les femmes co-infectées présentent des charges virales VHC « 10 fois plus élevées » que les femmes infectées uniquement par le VHC. Or la charge virale demeure fortement associée à la TME du VHC, si bien qu'on n'a rapporté que de rares cas de TME en deçà d'une virémie maternelle de  $1 \times 10^6$  copies d'ARN VHC par ml de plasma (« charge virale seuil ») [31]. Cette situation diffère de celle du VIH, pour lequel une faible virémie n'écarte pas les risques de TME, qui peut parfois se produire lorsque la mère présente une virémie inférieure à 1 000 copies d'ARN par ml de plasma [34]. (2) Si le VHC était capable d'infecter les cellules trophoblastiques *in vivo*, à l'instar du virus du Nil Occidental [35], un autre Flaviviridae, il se pourrait que la co-infection par le VIH potentialise sa répllication dans ce tissu ou encore induise sa transcytose à travers la barrière placentaire. Ce mécanisme pourrait également expliquer l'augmentation de la TME du VIH en présence de co-infection VIH-VHC. (3) Chez la femme infectée par le VIH et chez les UDI en général, on retrouve une forte prévalence de chorioamniotite aiguë et chronique [36], deux états inflammatoires qui pourraient favoriser le transit non seulement du VHC mais aussi du VIH à travers des microlésions placentaires. (4) L'infection par le VIH est associée à une profonde immunodéficience, tant au niveau humoral que cellulaire, déficience qui affecte également l'immunité anti-VHC [37] et pourrait indirectement faciliter la TME. On sait que l'évolution clinique de l'hépatite C est modifiée durant la grossesse et après l'accouchement, et que cette modulation comporte une forte composante immunitaire [38]. On sait également que la présence du VIH et l'immunodéficience qui y est associée sont capables d'influencer la charge et la dynamique des populations virales du VHC durant la grossesse et chez l'enfant co-infecté [39–41]. Le traitement de choix de l'infection par le VHC, une combinaison de ribavirine et



d'IFN- $\alpha$  pégylé, est fortement contre-indiqué durant la grossesse, la ribavirine étant tératogène [42] et l'IFN- $\alpha$  possédant des propriétés antiprolifératives et neurotoxiques [43]. D'où l'importance d'un traitement efficace de l'infection par le VIH chez la femme co-infectée, traitement qui, en agissant directement sur la charge virale VIH et indirectement sur la reconstitution immunitaire, devrait contribuer à réduire les risques de TME du VHC. Enfin, la co-transmission du VIH et du VHC à l'enfant, bien que moins fréquente que la transmission individuelle de chacun des virus, peut avoir chez ce dernier d'importantes conséquences pathologiques à long terme [39].

## **QUESTIONS CRIANTES ET DÉFIS RÉCENTS**

Vingt ans après la découverte de la TME du VIH et plus de 15 ans après la découverte du VHC, un grand nombre de questions criantes et de problèmes émergents demeurent. Au début des années 1990, l'incidence de la TME du VIH était d'environ 15 à 25 % dans les pays développés, ces chiffres ont diminué pour atteindre moins de 2 % aujourd'hui grâce à la prophylaxie antirétrovirale, à la pratique de la césarienne programmée et à l'allaitement artificiel. Cependant, l'accès au traitement est toujours cruellement déficient dans les régions du Globe les plus durement touchées par la pandémie et par la possible dissémination de souches résistantes à la névirapine chez la mère et l'enfant qui reste un problème considérable dans le contexte de l'utilisation à court terme de ce seul agent. Dans la plupart des pays industrialisés, la sélection de souches multi-résistantes lors de traitements anti-VIH à long terme complique la programmation de la thérapie et en compromet l'efficacité, ceci en dépit de la disponibilité d'un éventail sans cesse croissant d'agents antirétroviraux ciblant diverses phases du cycle de réplication viral (inhibiteurs de fusion, antagonistes de corécepteurs, inhibiteurs d'intégrase). Les difficultés reliées à la non-adhésion au traitement et les effets secondaires limitent également l'efficacité de la thérapie. Enfin, bien qu'aucune corrélation solide n'ait encore été établie entre génotype viral et incidence de la TME, la diffusion croissante des souches non-B du VIH, un phénomène global mais qui n'a été que récemment observé en Amérique du Nord et qui est étroitement lié aux mouvements migratoires à partir de régions à haute endémicité [44], pose un défi autant pour le dépistage et le traitement de l'infection chez la femme enceinte que pour le design vaccinal. Quant à la TME de l'hépatite

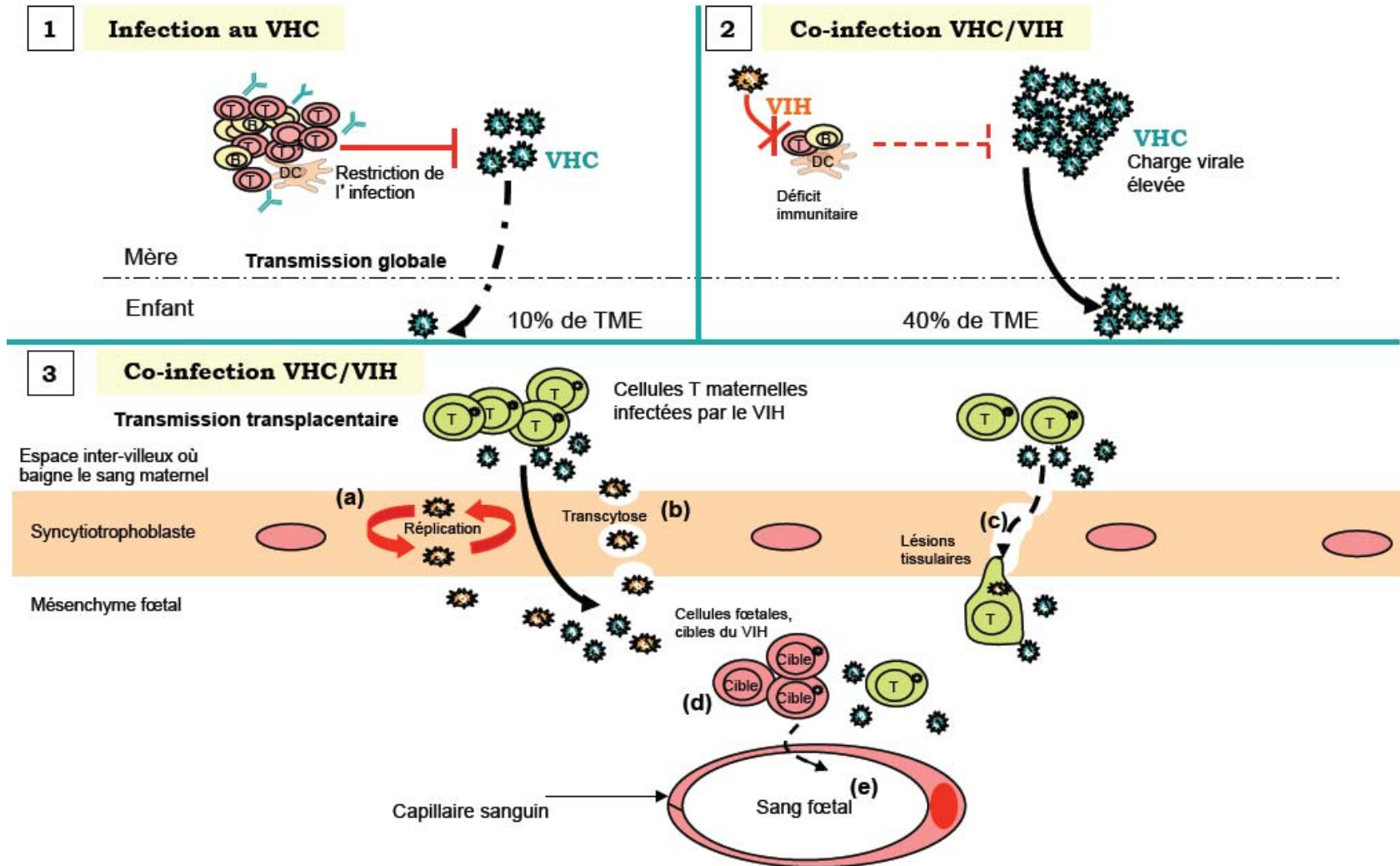
C, le traitement par l'IFN- $\alpha$  pourrait être envisageable chez la femme enceinte mais uniquement dans les cas d'infection aiguë ou de maladie hépatique avancée [45]. De son côté, le bénéfice réel de la pratique de la césarienne programmée dans le contexte de la TME du VHC n'a pas encore été formellement établi [32]. Plusieurs agents antiviraux ciblant le VHC (BILN 2061, VX-950, SCH 503034) sont en cours d'évaluation et certains d'entre eux atteindront bientôt des phases d'essais cliniques avancées. De la même façon que le traitement préventif de la TME du VIH par les agents antirétroviraux, une éventuelle disponibilité d'agents anti-VHC en clinique aurait de bonnes chances de changer la situation en ce qui concerne le traitement de l'hépatite C et la prophylaxie antivirale durant la grossesse.

## **REMERCIEMENTS**

Les auteurs souhaitent remercier les patients de la Cohorte mère-enfant du CMIS pour leur participation, ainsi que Ampha Khammy, Silvie Valois et Martine Caty pour leur assistance. Soutenu par le Réseau sida et maladies infectieuses du Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), par l'initiative de recherche sur l'hépatite C des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et de Santé Canada (EOP-41537), par CANFAR, la Fondation canadienne de recherche sur le sida (subvention no013515) et par la Elizabeth Glaser Pediatric AIDS Foundation.

Hugo Soudeyns est soutenu en partie par le Réseau SIDA et maladies infectieuses du Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), l'initiative stratégique de recherche sur le VIH/Sida des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et CANFAR, la Fondation canadienne de recherche sur le SIDA.

Figure 1.



## **LÉGENDE DE LA FIGURE**

### **Conséquences de la co-infection sur la transmission mère-enfant du virus de l'hépatite C.**

L'infection par le VHC induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire qui maintient la charge virale plasmatique à un bas niveau. Dans ces conditions, le VHC se transmet de la mère à l'enfant dans 10 % des cas (1). Dans le contexte de la co-infection, l'immunosuppression induite par le VIH affecte également l'immunité anti-VHC, ce qui augmente la charge virale plasmatique du VHC. L'incidence de la TME se trouve alors augmentée jusqu'à 4 fois (2). Le VIH pourrait traverser la barrière placentaire en infectant la couche trophoblastique (3a) ou encore par transcytose (3b), la présence du VIH induisant ou favorisant le passage transplacentaire du VHC par des mécanismes similaires. Enfin, la chorioamniotite, fréquente chez la femme séropositive pour le VIH, entraînerait l'apparition de lésions tissulaires, brèches à travers lesquelles les cellules infectées et les virions pourraient transiter du côté maternel vers le côté fœtal (3c). Ils pourraient alors infecter des cellules cibles (3d), accédant ensuite à la circulation fœtale (3e).

## Références

1. Oleske J, Minefor A, Cooper R, et al. Immune deficiency syndrome in children. *JAMA* 1983; 249 : 2345–9.
2. Cowan MJ, Hellmann D, Chudwin D, et al. Maternal transmission of acquired immune deficiency syndrome. *Pediatrics* 1984; 73 : 382–6.
3. Lapointe N, Michaud J, Pekovic D, et al. Transplacental transmission of HTLV-III virus. *N Engl J Med* 1985; 312 : 1325–6.
4. UNAIDS. AIDS epidemic update : December 2006. Genève, Suisse : UNAIDS, 2006.
5. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5 : 558–67.
6. Shafran SD. Early initiation of antiretroviral therapy : the current best way to reduce liver-related deaths in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007 online (sois presse).
7. Lagaye S, Derrien M, Menu E, et al. European network for the study of in utero transmission of HIV-1. Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol* 2001; 75 : 4780–91.
8. Tscherning-Casper C, Papadogiannakis N, Anvret M, et al. The trophoblastic epithelial barrier is not infected in full-term placentae of human immunodeficiency virus-seropositive mothers undergoing antiretroviral therapy. *J Virol* 1999; 73 : 9673–8.
9. Mundy DC, Schinazi RF, Gerber AR, et al. Human immunodeficiency virus isolated from amniotic fluid. *Lancet* 1987; 2 : 459–60.
10. Tuomala RE, O’Driscoll PT, Bremer JW, et al. Cell-associated genital tract virus and vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 in antiretroviral-experienced women. *J Infect Dis* 2003; 187 : 375–84.
11. Mandelbrot L, Burgard M, Teglas JP, et al. Frequent detection of HIV-1 in the gastric aspirates of neonates born to HIV-infected mothers. *AIDS* 1999; 13 : 2143–9.
12. Thiry L, Sprecher-Goldberger S, Jonckheer T, et al. Isolation of virus from cell free breast milk of three healthy virus carriers. *Lancet* 1985; 2 : 891–2.

13. Rousseau CM, Nduati RW, Richardson BA, et al. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 RNA in breast milk and of its relationship to infant infection and maternal disease. *J Infect Dis* 2003; 187 : 741–7.
14. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331 : 1173–80.
15. Perinatal HIV Guidelines Working Group. Public health Service Task Force recommendations for the use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1 infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV-1 transmission in the United States. Bethesda, MD : National Institutes of Health, 2006.
16. Soudeyns H, Yao XJ, Gao Q, et al. Anti-HIV-1 activity and in vitro toxicity of 2'-deoxy, 3'-thiacytidine (BCH-189), a novel heterocyclic nucleoside analog. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35 : 1386–90.
17. Rodrigues A, Faucher P, Batallan A, et al. Mode of delivery of HIV-infected women : a retrospective study of 358 pregnancies followed in the same hospital between 2000 and 2004. *Gynecol Obstet Fertil* 2006; 34 : 304–11.
18. Guay LA, Musoke P, Fleming T, et al. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda : HIVNET 012 randomized trial. *Lancet* 1999; 354 : 795–802.
19. Lallemand M, Jourdain G, Le Coeur S, et al. Single-dose perinatal nevirapine plus standard zidovudine to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in Thailand. *N Engl J Med* 2004; 351 : 217–28.
20. Newell ML, Dunn DT, Peckham CS, Semprini AE, Pardi G. Vertical transmission of HIV-1 : maternal immune status and obstetric factors. The European Collaborative Study. *AIDS* 1996; 10 : 1675–81.
21. Plaeger S, Bermudez S, Mityas Y, et al. Decreased CD8 cell-mediated viral suppression and other immunologic characteristics of women who transmit human immunodeficiency virus to their infants. *J Infect Dis* 1999; 179 : 1388–94.
22. Pillay T, Zhang HT, Drijfhout JW, et al. Unique acquisition of cytotoxic T-lymphocyte escape mutants in infant human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2005; 79 : 12100–5.

23. Wu X, Parast AB, Richardson BA, et al. Neutralization escape variants of human immunodeficiency virus type 1 are transmitted from mother to infant. *J Virol* 2006; 80 : 835–44.
24. MacDonald KS, Embree J, Njenga S, et al. Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* 1998; 177 : 551–6.
25. Cheynier R, Langlade-Demoyen P, Marescot MR, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur J Immunol* 1992; 22 : 2211–7.
26. Silvestri G, Soudeyns H, Lapointe N, et al. T-cell receptor V $\beta$ -specific expansions in children from HIV-infected mothers. *AIDS* 1996; 10 : 549–51.
27. Soudeyns H, Champagne P, Holloway CL, et al. Transient T cell receptor BV-specific expansions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells during the early phase of pediatric human immunodeficiency virus infection : characterization of expanded cell populations by T cell receptor phenotyping. *J Infect Dis* 2000; 181 : 107–20.
28. Safrit JT, Ruprecht R, Ferrantelli F, et al. Immunoprophylaxis to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 35 : 69–77.
29. Xu W, Hofmann-Lehmann R, McClure HM, et al. Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies : correlates of protective immunity against HIV. *Vaccine* 2002; 20 : 1956–60.
30. Binley JM, Wrin T, Korber B, et al. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* 2004; 78 : 13232–52.
31. Thomas SL, Newell ML, Peckham CS, Ades AE, Hall AJ. A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission : risks of transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. *Int J Epidemiol* 1998; 27 : 108–17.
32. Boucher M, Gruslin A, Delage G, et al. The reproductive care of women living with hepatitis C infection – Les soins de santé en reproduction pour les femmes vivant avec l'hépatite C. Health Canada/Santé Canada and/et SOGC Clinical Practice Guidelines / Directives cliniques de la SOGC. *J Soc Obstet Gynaecol Can* 2000; 22 : 820–44.

33. Mok J, Pembrey L, Tovo PA, Newell ML, European Paediatric Hepatitis C Virus Network. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur ? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005; 90 : 156–60.
34. Ioannidis JP, Abrams EJ, Ammann A, et al. Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads < 1000 copies/ml. *J Infect Dis* 2001; 183 : 539–45.
35. King NJ, Maxwell LE, Kesson AM. Induction of class I major histocompatibility complex antigen expression by West Nile virus on gamma interferon-refractory early murine trophoblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 : 911–5.
36. Chi BH, Mudenda V, Levy J, et al. Acute and chronic chorioamnionitis and the risk of perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Am J Obs Gynecol* 2006; 194 : 174–81.
37. Lauer GM, Nguyen TN, Day CL et al. Human immunodeficiency type 1-hepatitis C virus co-infection : intraindividual comparison of cellular immune responses against two persistent viruses. *J Virol* 2002; 76 : 2817–26.
38. Gervais A, Bacq Y, Bernuau J, et al. Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2000; 32 : 293–9.
39. Canobio S, Guilbert C, Troesch M, et al. Differing patterns of liver disease progression and hepatitis C virus (HCV) quasi species evolution in children vertically co-infected with HCV and human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 2004; 42 : 4365–9.
40. Troesch M, Jalbert E, Canobio S, et al. Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in patients co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* 2005; 19 : 775–84.
41. Troesch M, Meunier I, Lapierre P, et al. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 2006; 352 : 357–67
42. Ferm VH, Willhite C, Kilham L. Teratogenic effects of ribavirin on hamster and rat embryos. *Teratology* 1978; 17 : 93–101.
43. Dubois J, Hershon L, Carmant L, et al. Toxicity profile of interferon alfa-2b in children : A prospective evaluation. *J Pediatr* 1999; 135 : 782–5.
44. Akouamba BS, Viel J, Charest H, et al. HIV-1 genetic diversity in antenatal cohort, Canada. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 : 1230–4.



45. Ozaslan E, Yilmaz R, Simsek H, Tatar G. Interferon therapy for acute hepatitis C during pregnancy. *Ann Pharmacother* 2002; 36 : 1715–8.

