

Université de Montréal

Effet de l'initiation du traitement antirétroviral sur la diversité virale du VIH

Par
Annie Chamberland

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Docteur ès science (Ph.D)
en microbiologie et immunologie

Novembre 2009

©, Annie Chamberland, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Thèse intitulée :

Effet de l'initiation du traitement antirétroviral sur la diversité virale du VIH.

Présentée par :

Annie Chamberland

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Hugo Soudeyns

Directrice de recherche : Cécile Tremblay

Membre du jury : François Coutlée

Examineur externe : Nicole Bernard

Représentant du doyen : Éric Cohen

de la FES

Thèse acceptée le: _____

Sommaire

L'épidémie du VIH-1 dure maintenant depuis plus de 25 ans. La grande diversité génétique de ce virus est un obstacle majeur en vue de l'éradication de cette pandémie. Au cours des années, le VIH-1 a évolué en plus de cinquante sous-types ou formes recombinantes. Cette diversité génétique est influencée par diverses pressions de sélection, incluant les pressions du système immunitaire de l'hôte et les agents antirétroviraux (ARV). En effet, bien que les ARV aient considérablement réduit les taux de morbidité et de mortalité, en plus d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des personnes atteintes du VIH-1, ces traitements sont complexes, dispendieux et amènent leur lot de toxicité pouvant mener à des concentrations plasmatiques sous-optimales pour contrôler la réplication virale. Ceci va permettre l'émergence de variantes virales portant des mutations de résistance aux ARV. Ce phénomène est encore plus complexe lorsque l'on prend en considération l'immense diversité génétique des différents sous-types. De plus, le virus du VIH est capable de persister sous forme latente dans diverses populations cellulaires, rendant ainsi son éradication extrêmement difficile.

Des stratégies pouvant restreindre la diversité virale ont donc été préconisées dans le but de favoriser les réponses immunes de l'hôte pour le contrôle de l'infection et d'identifier des variantes virales offrant une meilleure cible pour des stratégies vaccinales ou immunothérapeutiques. Dans cet esprit, nous avons donc étudié, chez des sujets infectés récemment par le VIH-1, l'effet du traitement ARV précoce sur la diversité virale de la région C2V5 du gène enveloppe ainsi que sur la taille des réservoirs. En deuxième lieu, nous avons caractérisé la pression de sélection des ARV sur des souches virales de sous types variés non-B, chez des patients du Mali et du Burkina Faso afin d'évaluer les voies

[Type text]

d'échappement viral dans un fond génétique différent du sous-type B largement prévalent en Amérique du Nord.

Notre étude a démontré la présence d'une population virale très homogène et peu diversifiée dans les premières semaines suivant l'infection, qui évolue pour atteindre une diversification de +0,23% à la fin de la première année. Cette diversification est plus importante chez les sujets n'ayant pas initié de traitement. De plus, ceci s'accompagne d'un plus grand nombre de particules virales infectieuses dans les réservoirs viraux des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) chez ces sujets. Ces résultats suggèrent que l'initiation précoce du traitement pourrait avoir un effet bénéfique en retardant l'évolution virale ainsi que la taille des réservoirs, ce qui pourrait supporter une réponse immune mieux ciblée et potentiellement des stratégies immunothérapeutiques permettant d'éradiquer le virus.

Nous avons également suivi 801 sujets infectés par des sous-types non-B sur le point de débiter un traitement antirétroviral. Bien que la majorité des sujets ait été à un stade avancé de la maladie, plus de 75% des individus ont obtenu une charge virale indétectable après 6 mois d'ARV, témoignant de l'efficacité comparable des ARV sur les sous-types non-B et B. Toutefois, contrairement aux virus de sous-type B, nous avons observé différentes voies moléculaires de résistance chez les sous type non-B, particulièrement chez les sous-types AGK/AK/K pour lesquels les voies de résistances étaient associées de façon prédominante aux TAM2. De plus, bien que la divergence entre les virus retrouvés chez les

patients d'une même région soit faible, nos analyses phylogénétiques ont permis de conclure que ces mutations de résistance se sont produites *de novo* et non à partir d'un ancêtre commun porteur de résistance. Cependant, notre dernière étude au Mali nous a permis d'évaluer la résistance primaire à près de 10% et des études phylogénétiques seront effectuées afin d'évaluer la circulation de ces souches résistantes dans la population.

Ces études suggèrent qu'un contrôle de la réplication virale par les ARV peut freiner la diversité du VIH et ainsi ouvrir la voie à un contrôle immunologique ciblé, utilisant de nouvelles stratégies vaccinales ou immunothérapeutiques. Toutefois, une thérapie antirétrovirale sous-optimale (adhérence, toxicité) peut conduire à l'échappement virologique en favorisant l'émergence et la dissémination de souches résistantes.

Mot-clés

VIH-1, évolution virale, primo infection, sous-type, variants viraux, traitement antirétroviraux, mutations de résistance

Summary

The HIV epidemic has been ongoing for 25 years. The striking genetic diversity of this virus is a formidable obstacle to the eradication of the pandemic. Throughout the years, HIV-1 has evolved in more than fifty subtypes and circulating recombinants forms. This evolution is shaped by selective pressures including the host immune responses and sub-optimal HAART treatment. In the era of HAART, HIV associated morbidity and mortality has decreased dramatically and significantly improved the life expectancy of infected individuals. However, treatments are complex, expensive and are associated with toxicity. When viral replication is not fully contained, drug mutations arise which further complicate treatment options. This phenomenon is even more complex when taking into account the great genetic diversity of various HIV-1 subtypes. HIV also has the capacity to persist in different cellular population and thus eradication is extremely difficult to achieve.

Strategies aiming at limiting viral diversity and improving the host immune responses to control HIV replication are needed. The identification of conserved viral variants could ultimately be useful in vaccine design or as an immunotherapeutic target. Thus, we have studied the effects early HAART during primary HIV infection has on viral diversity in the C2V5 region of the *env* gene and on the size of viral reservoir. We then characterized the selective pressure of ARV on non-B subtype and evaluated drug resistance pathways in non-B HIV genetic background in infected subjects from Mali and Burkina Faso as they initiated treatment.

Our study demonstrated a homogenous viral population during the first weeks post infection. Viral diversity did increase during the first year to reach +0.23% at the end of the first year post infection. Patients not initiating treatment exhibited a higher magnitude of viral diversity, and the size of their viral reservoir as determined by the number of infectious units per million PBMC's also reached higher values. Our results suggest that early treatment, by slowing viral evolution and size of viral reservoir, could permit strong immune system responses against contemporaneous viruses and could help achieved eradication.

In another study, we followed 801 patients infected with non-B subtype who were about to start antiretroviral therapy. The majority of these patients were at advanced stages of the infection. Nevertheless, more than 75% achieved undetectable viral load after 6 months of therapy. This very encouraging result led us to conclude that antiretroviral therapy was efficient in controlling replication in non-B subtype infection at similar level than in subtype B infection. In contrast to subtype B infection, we observed different molecular resistance pathways in non-B subtypes, particularly in the AGK/AK/K subtype for which mutations were predominantly associated with the TAM2 pathway. Although our phylogenetic analysis showed a very closely related viral population in our population, we were able to determine that those mutations were not from a common ancestral virus transmitted in this population but rather were emerging *de novo* in those patients. We conducted another study in Mali and our results showed a primary drug resistance frequency of 10%. We are now conducting phylogenetic studies to evaluate the prevalence of drug resistance virus transmission in this population.

Our studies suggest that controlling viral replication by treatment could delay viral evolution. A slower viral diversity could have a beneficial effect on the immune system and could lead to the development of new vaccines or immunotherapeutics strategies. However, sub-optimal drugs concentrations (poor adherence, toxicity) could lead to viral escape and emergence of virus bearing drug resistance mutations which could further be disseminated in the population.

Key Words

HIV-1, viral evolution, acute infection, subtype, viral variants, antiretroviral treatment, drug resistance mutation

Table des matières

Sommaire	iii
Summary	vii
Table des matières.....	xi
Liste des figures	xv
Liste des abréviations.....	xvii
Les acides aminés.....	xix
Médicaments antirétroviraux.....	xx
1. Introduction	1
1.1 AMPLEUR DE L'ÉPIDÉMIE.....	2
1.2 HISTORIQUE.....	5
1.3 Virologie.....	6
1.3.1 Structure	7
1.3.2 Cycle réplicatif	9
1.3.2.1 L'entrée.....	9
1.3.2.1.1 Liaison avec le récepteur (CD4).....	9
1.3.2.1.2 Liaison avec le co-récepteur.....	13
1.3.2.2 Fusion membranaire	16
1.3.2.3 Décapsidation, intégration	18
1.3.2.4 Assemblage.....	22
1.3.2.5 L'infection primaire.....	26
1.3.2.5.1 Les différents stades de l'infection	26
1.3.2.5.2 Les réponses immunitaires face à l'infection par le VIH.....	28
1.3.2.5.2.1 Immunité innée.....	29
1.3.2.5.2.2 Immunité adaptative	30
1.3.2.6 L'infection chronique	34
1.3.2.7 Les réservoirs.....	34
1.4 Diversité génétique	39

1.4.1	Origine du VIH et de sa diversité génétique.....	39
1.4.1.1	Origine du VIH-zoonose virale.....	39
1.4.1.2	VIH-2.....	41
1.4.1.3	VIH-1.....	41
1.4.2	Distribution géographique et prévalence des sous-types VIH-1.....	43
1.4.3	Évolution virale et apparition des variantes.....	44
1.4.3.1	Facteurs Viraux.....	45
1.4.3.1.1.1	Erreurs de la transcriptase inverse.....	45
1.4.3.1.1.2	Recombinaison virale.....	46
1.4.3.1.1.3	La capacité répliquative (fitness).....	46
1.4.3.1.1.4	Sites de glycosylation.....	47
1.4.3.1.1.5	Longueur des boucles V1/V2, V3, V4/V5.....	48
1.4.3.2	Facteur de l'hôte.....	49
1.4.3.2.1.1	Pression du système immunitaire.....	49
1.4.3.2.1.2	Les anticorps neutralisants/CMH de classe II.....	50
1.4.3.2.1.3	Les lymphocytes cytotoxiques/CMH de classe I.....	50
1.4.3.2.1.4	Facteur de restriction-APOBEC.....	51
1.4.3.3	Pression de sélection des ARV.....	52
1.4.3.3.1.1	Principes et définition.....	52
1.4.3.3.1.1	Résistance naturelle aux ARV.....	53
1.4.3.3.1.2	Développement de résistance chez les sous-types non-B.....	54
1.4.3.3.1.3	La résistance primaire aux antirétroviraux.....	57
1.4.3.4	Maladie sous-jacente.....	58
1.4.3.5	Compartiment/Réservoir.....	59
1.4.4	Étude de la diversité.....	59
1.4.4.1	La distance/divergence.....	61
1.4.4.2	Diversité intra-patient et évolution de la maladie.....	62
1.5	Hypothèses.....	66

2. Résultats	67
2.1 Effet du traitement antirétroviral sur la diversité virale durant la primo-infection	68
Acknowledgements	84
2.2 Étude de la résistance chez les sous-types non-B	95
2.3 Characterization of drug resistance in antiretroviral treated patients infected with HIV-1 CRF02_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso	121
3. Discussion.....	145
4. Conclusion.....	174
5. Annexe I- Article supplémentaire.....	176
Low Prevalence of Detectable HIV Plasma Viremia in Patients Treated With Antiretroviral Therapy in Burkina Faso and Mali	177
6. Bibliographie	210

Liste des figures

FIGURE 1 : Infections à VIH 2007 : aperçu mondial.....	3
FIGURE 2 : Virion du VIH.....	8
FIGURE 3 : Structure de la gp120.....	11
FIGURE 4 : Représentation schématique de la gp120.....	12
FIGURE 5 : Illustration schématique de la séquence d'acides aminés du récepteur CCR5.....	14
FIGURE 6 : Illustration schématique de l'entrée du VIH.....	17
FIGURE 7 : Description des événements suivant l'infection d'une cellule.....	21
FIGURE 8 : Stades de l'infection par le VIH.....	28
FIGURE 9 : Comparaison de l'évolution virale du virus de l'influenza et du VIH.....	40
FIGURE 10 : Représentation schématique des sous-types du VIH-1 et VIH-2.....	42
FIGURE 11 : Représentation schématique de la forme recombinante CRF02_AG.....	43

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ART:	Thérapie antirétrovirale
CCR5 :	Chemokine (C-C motif) receptor 5
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
cpx :	Forme complexe
CRF :	Forme recombinante circulante
CTL :	Lymphocytes cytotoxiques
CXCR4:	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
Env :	Gène de l'enveloppe du VIH-1
ESCRT-1:	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
GALT:	Gut-Associated Lymphoid Tissue
Gp120:	Glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1
Gp41 :	Sous unité de la gp120 du VIH-1
HAART :	Highly active antiretroviral therapy
HLA :	Antigènes des leucocytes humains
IL-2:	Interleukine 2
INNTI :	Inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI :	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse

INTI :	inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse
IP :	Inhibiteur de la protéase
Kb:	Kilobase
MIP-1 α ou β :	Macrophage Inflammatory Proteins (CCL3, CCL4)
ml :	Millilitre
Nabs :	Anticorps neutralisants
P24 :	Protéine P24 du VIH
PBMCs:	Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS:	Phosphate buffered saline
PHA :	Phytohemagglutinin
Pol :	Gène codant pour la polymérase
R5:	VIH utilisant le corécepteur CCR5
RANTES :	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RT:	Transcriptase inverse
SIV :	Virus de l'immunodéficience simienne
TAM1/2 :	Thymidine analogue-associated mutations
TCR :	Récepteur lymphocytes T
VIH-1/2:	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 ou 2
X4:	VIH utilisant le corécepteur CXCR4
μ g:	Microgramme
μ l:	Microlitre

Les acides aminés

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

Médicaments antirétroviraux

Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI)

- Abacavir (ABC)
- Didanosine (ddI)
- Emtricitabine (FTC)
- Lamivudine (3TC)
- Stavudine (d4T)
- Zidovudine (ZDV)

Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse (INtTI)

- Tenofovir (TDF)

Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

- Delavirdine (DLV)
- Efavirenz (EFV)
- Nevirapine (NVP)
- Etravirine (ETR)

Les Inhibiteurs de la protéase (IP)

- Amprenavir (AMP)
- Atazanavir (ATV)
- Darunavir (DRV)
- Fosamprenavir (fAPV)
- Indinavir (IDV)
- Lopinavir (LPV)
- Nelfinavir (NFV)

Saquinavir (SQV)

Tipranavir (TPV)

Ritonavir (RTV)

Les Inhibiteurs de l'Intégrase

Raltegravir (RAL)

Les Inhibiteurs de l'entrée

Enfuvirtide (ENF) Inhibiteur de la fusion

Maraviroc CCR5 antagoniste

1. Introduction

1.1 Ampleur de l'épidémie

Dans le dernier rapport de juillet 2008 sur l'état de l'épidémie mondiale de VIH/SIDA publié conjointement par ONUSIDA et l'Organisation Mondiale de la Santé ¹, les efforts de la lutte contre le VIH commencent à porter fruit. Une légère diminution du nombre de cas par année a été observée en 2007 ainsi qu'une diminution du nombre de décès. Ces améliorations sont certainement dues aux efforts de prévention systématisés, en lien avec une plus grande accessibilité aux traitements antirétroviraux dans les régions à ressources limitées et qui sont les plus touchées. Toutefois, l'accès au traitement est fragilisé par la faiblesse des infrastructures médicales, un manque de ressources humaines, l'instabilité politique de plusieurs pays ainsi qu'un manque de financement durable. Toutes ces difficultés entraînent de fréquentes pénuries. Alors que la situation se stabilise dans certaines régions, plusieurs pays sont aux prises avec une augmentation du nombre de cas tels : la Chine, l'Allemagne, l'Indonésie, le Mozambique, la Papouasie Nouvelle-Guinée, la fédération Russe, l'Ukraine, l'Angleterre et le Viet Nam. Dans d'autres régions comme le Swaziland, l'Afrique du Sud, le Lesotho et la Namibie, la prévalence s'est stabilisée mais à des niveaux très élevés (voir figure 1). Bien que le nombre d'individus ayant accès aux antirétroviraux ait augmenté, la majorité des personnes ayant besoin de traitement n'y ont toujours pas accès. À la fin de 2007, environ 3 millions de personnes suivaient un traitement antirétroviral, soit près d'un million de plus qu'en 2006. En dépit de ces progrès, la couverture demeure faible. À peine 31% des personnes nécessitant un traitement le reçoivent. Pire encore, le nombre de nouveaux cas annuel outrepassa de 2 fois et demie le

nombre de personnes ayant obtenu l'accès au traitement au cours de cette même année. Finalement, lorsqu'elles obtiennent accès aux traitements, elles sont souvent à des stades avancés de la maladie ¹.

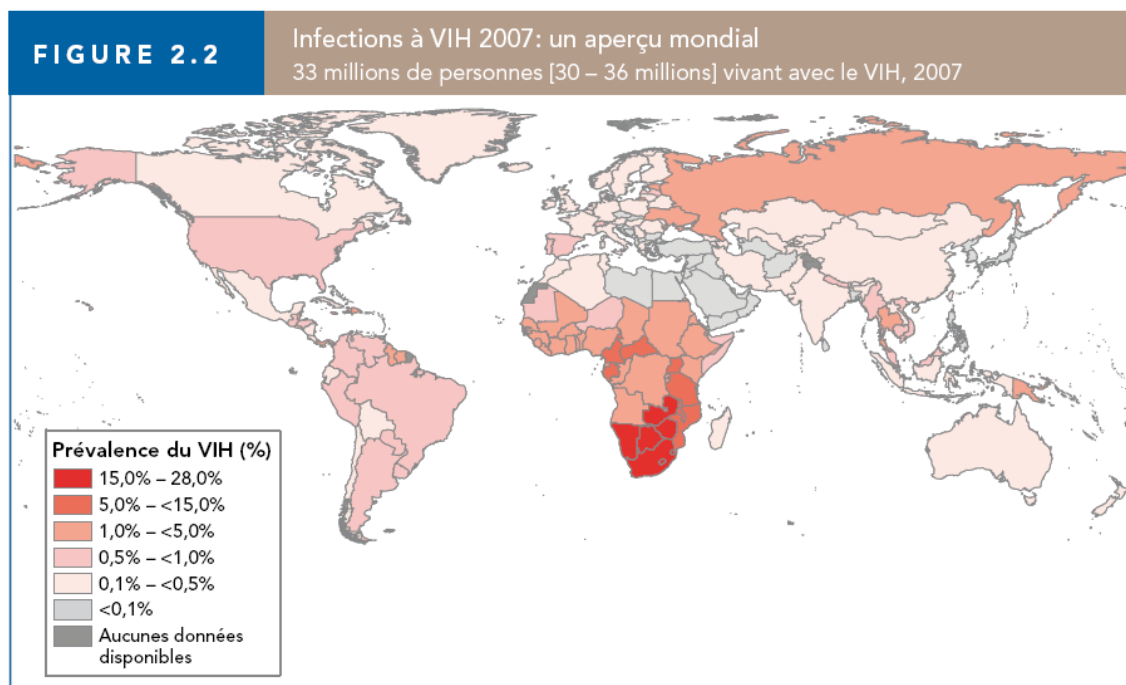


Figure 1 Infections à VIH 2007 : aperçu mondial 33 millions de personnes (30-36 millions) vivant avec le VIH en 2007, Prévalence du VIH chez l'adulte (%) par pays ¹.

Globalement, le nombre de personnes vivant avec le VIH n'a jamais été aussi élevé. En effet, plus de 33 millions de personnes vivent avec le VIH dans le monde, dont 15 millions de femmes et près de 3 millions d'enfants de moins de 15 ans. Chaque année, environ 2.7 millions de personnes seront infectées et plus de deux millions en mourront. L'Afrique subsaharienne continue d'être la région la plus touchée et le VIH/SIDA y est la principale

cause de mortalité. À elle seule, cette région compte pour plus de 68% des cas chez l'adulte, 90% des cas chez les enfants et plus de 75% des décès y surviennent, illustrant tragiquement les manques criants en matière d'accès aux soins de santé et aux traitements antirétroviraux dans cette région. De plus, les femmes sont majoritairement touchées, constituant 61% des cas. Homme ou femme, cette infection virale atteint principalement de jeunes adultes qui, en bonne santé, débuteraient leur rôle dans la société active et devraient contribuer à l'essor de leur communauté. Malheureusement, ce sont des générations entières qui sont pratiquement condamnées dans plusieurs pays sub-sahariens. L'infection par le VIH est responsable de changements majeurs dans la structure de plusieurs populations africaines. Ces effets se répercutent durement sur l'économie, mettant ainsi en péril le développement de plusieurs pays déjà aux prises avec d'énormes problèmes de pauvreté. L'épidémie de VIH/SIDA pose un défi aux objectifs du millénaire proposés par l'ONU afin de contrer la pauvreté dans le monde. Ces efforts ne pourront être couronnés de succès sans une population en santé. Il est primordial que les enfants soient en santé afin qu'ils puissent aller à l'école et y performer. Également, leurs parents doivent aussi être en santé afin de leur prodiguer les soins et l'attention nécessaires et pouvoir contribuer activement au développement de leur communauté. La lutte contre la pauvreté est intimement liée à la lutte contre le VIH-SIDA. Il est donc évident que malgré une diminution des estimations des nouveaux cas et de la mortalité associées au VIH/SIDA, la gravité et les conséquences de cette pandémie demeurent entières et l'urgence d'agir est plus que jamais d'actualité.

1.2 Historique

Au début des années 1980, plusieurs cas de pneumonie à *Pneumocystis carinii* et de sarcome de Kaposi sont observés dans plusieurs grandes villes des États-Unis notamment à New York et Los Angeles ainsi qu'en Europe ²⁻⁵. Il s'agit de deux maladies affectant habituellement des personnes immunosupprimées, or ces gens ne sont pas connus pour un déficit immunitaire. Ils ne partagent qu'une seule caractéristique : il s'agit d'hommes homosexuels. Dans les mois suivants, plusieurs nouveaux cas sont identifiés, cette fois chez des individus hémophiles ainsi que chez des toxicomanes utilisateurs de drogues intraveineuses ce qui permet de conclure à un mode de transmission sanguin ^{6, 7}. Commence alors une course vers l'isolation du pathogène responsable. Ce sont les chercheurs français Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier de l'institut Pasteur qui, les premiers, ont identifié le virus en 1983, ce qui leur a mérité le prix Nobel de Médecine en 2008 ⁸. Simultanément, aux États-Unis, l'équipe du Dr. Gallo ainsi qu'une troisième équipe de recherche dirigée par le Dr. Levy, réussissent à isoler le virus à partir d'échantillons de patients infectés ^{9, 10}. D'abord connu sous diverses appellations soit : LAV, HTLV-3 et ARV selon l'équipe de recherche impliquée, le séquençage complet du génome viral permet, en 1985, de conclure que les trois virus identifiés étaient en fait le même pathogène ¹¹. En 1986, l'équipe du Dr. Montagnier récidive et isole un second type de LAV, le LAV-2, à partir du sang d'un patient de l'Afrique de l'Ouest ¹². Finalement, en 1986 le virus LAV, HTLV-3 et ARV devient officiellement le virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 et le LAV-2 le VIH-2.

1.3 Virologie

Le VIH-1 est un virus enveloppé à génome d'ARN de la famille des *Retroviridae* dont les membres sont appelés rétrovirus. Cette famille tire son nom de sa caractéristique principale, c'est-à-dire la présence d'une enzyme polymérase transcriptase inverse ARN-dépendante qui permet la synthèse de l'ARN en ADN, qui sera par la suite intégrée au génome de l'hôte. La transcriptase inverse n'a pas de mécanisme de correction et est donc très sujette à des erreurs de transcription, ce qui résulte en une très grande variation génétique chez les nouvelles générations virales ¹³. À ce jour, quatre rétrovirus affectant l'humain ont été décrits soit : HTLV 1-2 ainsi que le VIH-1-2. La famille des rétrovirus est également divisée en trois sous-familles : les oncovirus, les spumavirus ainsi que les lentivirus, sous-famille à laquelle appartiennent le VIH-1 et VIH-2. Les lentivirus (lenti-lent en latin) sont des virus causant des pathologies ayant une évolution très lente et sont cytopathogènes pour les cellules qu'ils infectent, provoquant ainsi, à long terme, un état d'immunosuppression chez l'hôte infecté. Tous ces virus possèdent une organisation semblable et on retrouve les gènes *pol*, *gag* et *env* chez tous les rétrovirus. Une autre caractéristique spécifique des rétrovirus est leur intégration au génome de l'hôte qu'ils infectent. D'ailleurs, le séquençage complet du génome humain a permis de découvrir qu'environ 8% de notre génome est, en fait, d'origine rétrovirale ¹⁴.

1.3.1 Structure

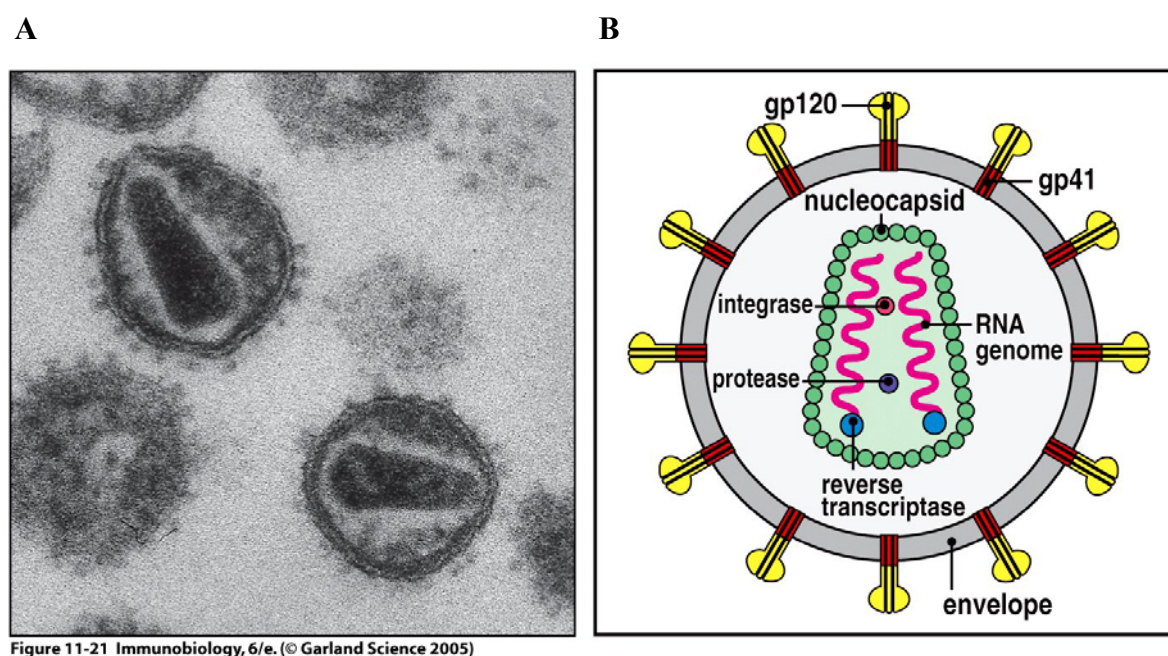
Le VIH-1 est doté d'un génome ARN simple brin en double copie de polarité positive de 9817 paires de bases protégé par une nucléocapside icosaédrique. C'est un virus possédant une enveloppe formée de trimères de la protéine gp160 et dont la taille est de 80-100 nm. Contrairement aux autres rétrovirus, le VIH-1-2 a une organisation beaucoup plus complexe. En plus des trois gènes communs aux rétrovirus (*gag*, *pol*, *env*), son ARN code pour 6 autres gènes permettant la synthèse de seize protéines dont 3 enzymes (transcriptase inverse, intégrase, protéase) 7 protéines dites structurales (gp41, gp120, matrice, nucléocapside, capsid, p7, p6) et 6 protéines accessoires soit : Rev, Nef, Vpu, Vpr, Tat, Vif.

Le gène *gag* est responsable de la synthèse des protéines qui composeront la structure virale, comme la capsid (p24), la nucléocapsid (p6, p7) ainsi que la matrice (p17). Le gène *pol* code pour les enzymes virales : la transcriptase inverse, l'intégrase, la protéase ainsi que la ribonucléase. Puis, le gène *env*, code pour les protéines gp41 et gp120 qui entrent dans la composition de l'enveloppe virale (gp160) contenant les déterminants interagissant avec le récepteur et le co-récepteur, essentiels à l'entrée dans la cellule. La gp41 est formée de trois domaines majeurs : l'ectodomaine responsable de la fusion, la région d'ancrage transmembranaire et la queue cytoplasmique.

Les gènes *tat*, *rev*, *vpu*, *vif*, *nef* et *vpr* sont dits gènes régulateurs et sont en charge de régulariser divers aspects de l'infection virale. La protéine Tat est un activateur de la transcription virale via le LTR alors que Rev joue un rôle de transport de l'ARN viral du noyau vers le cytoplasme.

Vpu, Vpr, Nef et Vif sont des protéines dites accessoires et sont, par conséquent, non-essentiels à la réplication virale. Par contre l'effet de ces protéines sur la dynamique virale et sur l'échappement au système immunitaire n'est pas négligeable. Notons également que le VIH-2 ne possède pas de protéine Vif.

Figure 2 : Virion du VIH.



A : Image de microscopie électronique du VIH. B structure schématisée du virion ¹⁵

1.3.2 Cycle répliatif^{16,17}

1.3.2.1 L'entrée

1.3.2.1.1 Liaison avec le récepteur (CD4)

Dès les débuts de la pandémie d'infection au VIH, il fut évident que le VIH cible principalement les lymphocytes T CD4+. Rapidement, le récepteur CD4+ à la surface des cellules fut identifié comme étant le récepteur primaire permettant l'infection par le SIV/VIH^{18,19}.

Le récepteur CD4 est un membre de la super famille des immunoglobulines et possède quatre domaines extracellulaires (D1 à D4), une région transmembranaire ainsi qu'une queue cytoplasmique. Ce récepteur est un ligand naturel pour le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Il est exprimé de façon prédominante à la surface des lymphocytes auxiliaires (T-helper). Son rôle est de favoriser l'activation de la cellule suite à une liaison avec une cellule présentatrice d'antigène. Le virus, via son enveloppe virale, va se lier au récepteur CD4 afin de pénétrer dans la cellule.

La gp120 est composée de cinq domaines constants (C1-C5) et de cinq régions hypervariables (V1-V5) (figure 3 et 4). Le site de liaison de haute affinité de la gp120 pour le récepteur CD4 est localisé sur un petit segment de la région extra-cellulaire N-terminale de celui-ci alors que pour la gp120, ce site est localisé entre le domaine interne "inner" et le

domaine externe “outer” connectés entre eux par le feuillet de liaison “bridging sheet” contenant la région C3 et C4^{20, 21} (figure 3,4). Toutefois, certains résidus, ailleurs dans l’enveloppe, jouent un rôle dans la liaison avec le récepteur CD4. De plus, cette protéine est fortement glycosylée et ces sucres comptent pour près de 50% de son poids moléculaire²². Les molécules de gp120 vont s’associer pour former un trimère et chaque particule virale est composée de plusieurs trimères d’enveloppe, chacune d’entre elles étant attachée de façon non-covalente à une molécule transmembranaire de la gp41^{23 24}. La gp120 est donc la partie la plus exposée du virus et les régions hypervariables sont positionnées vers la face externe de la protéine alors que la gp41 est relativement bien conservée. La liaison d’une seule molécule du trimère de gp120 à un récepteur CD4 est suffisante pour initier un changement de conformation de toute la molécule²⁵.

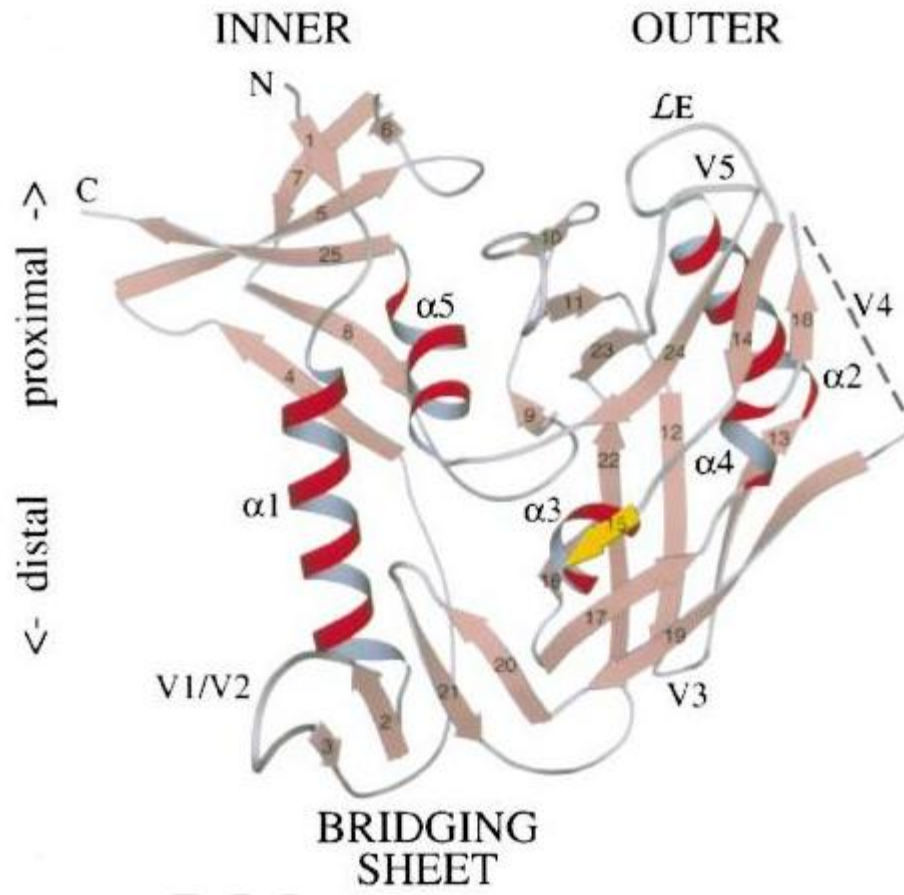


Figure 3 Structure de la gp120.

A) La région « inner » étant plus conservée que la région « outer » qui est plus variable. Le site de liaison avec le récepteur CD4 se trouve à l'interface de la région « inner » et « outer » le « bridging sheet ». ²⁰

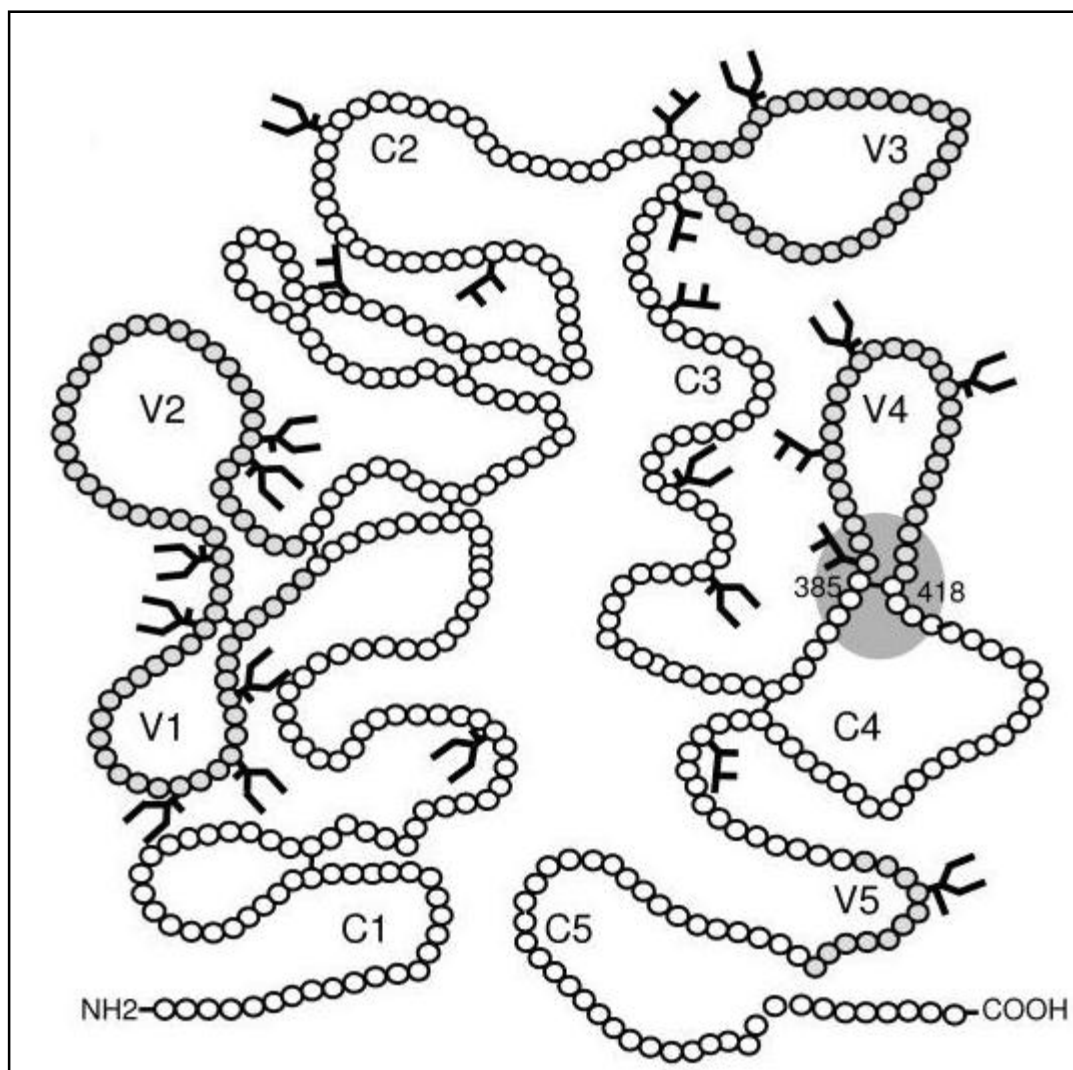


Figure 4 : Représentation schématique de la gp120. C1-C5 : domaines conservés, V1-V5 : domaines hypervariables ^{26, 27}

1.3.2.1.2 Liaison avec le co-récepteur

Malgré l'identification du CD4 comme récepteur majeur du VIH, plusieurs questions demeurent en suspens et, il devient alors évident que ce récepteur ne peut à lui seul être responsable de l'entrée du virus dans la cellule. D'abord, plusieurs études ont démontré que les virus obtenus à partir d'isolats cliniques avaient un tropisme variable pour les cellules CD4. En effet, certains virus dits alors macrophage-tropiques "M T-tropiques" se répliquaient efficacement dans les macrophages et dans les lymphocytes T alors que d'autres isolats, tout en étant capables de se répliquer dans les cellules T, n'y parviennent que faiblement dans les macrophages. Ces derniers furent alors nommés T-Tropiques. Plus d'une décennie de recherche intensive a été nécessaire afin d'ultimement identifier des molécules de la famille des récepteurs couplés aux protéines G possédant 7 domaines transmembranaires comme co-récepteurs d'entrée pour le VIH ^{28,29}

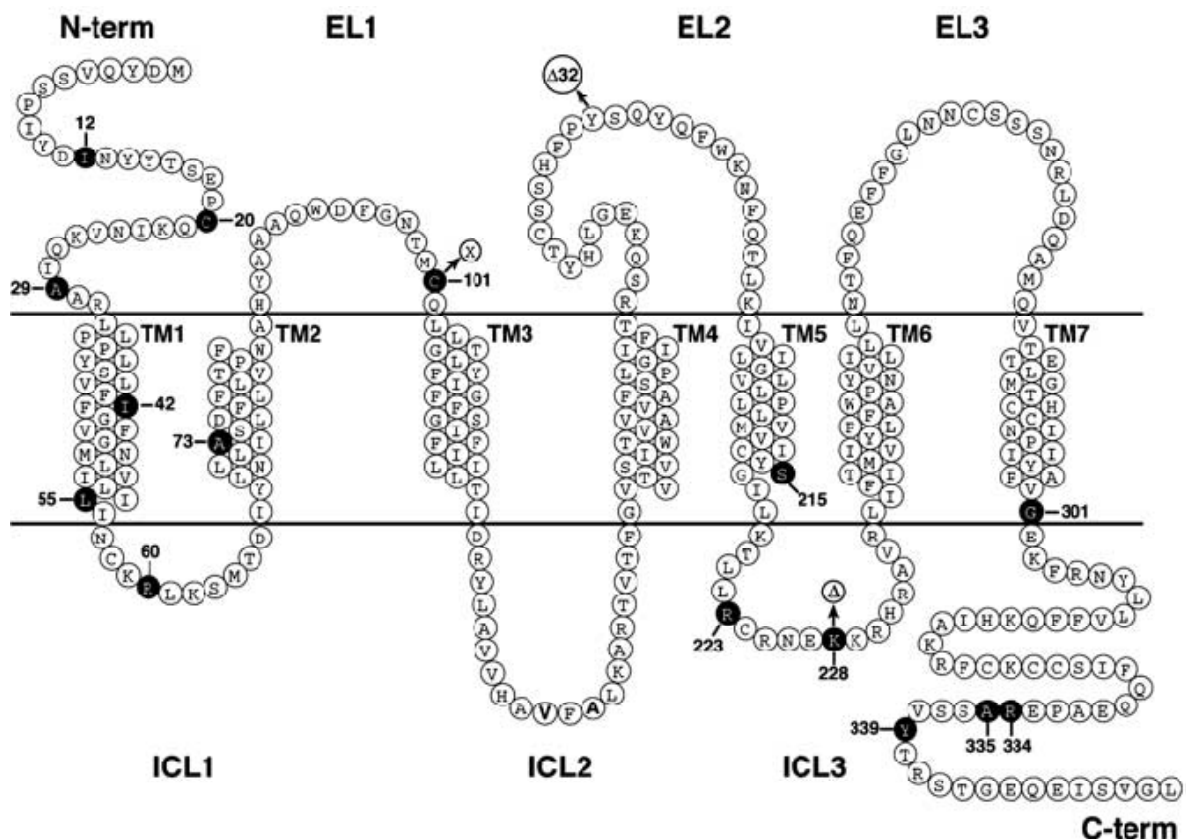


Figure 5 : Illustration schématique de la séquence d'acides aminés du récepteur CCR5.

TM1 à TM7 représentent les 7 domaines trans-membranaires ³⁰.

Ces récepteurs ont pour fonction de se lier aux chimiokines qui sont responsables de l'activation cellulaire ainsi que de la communication inter-cellulaire en vue d'une réponse immunitaire. Il existe deux groupes de récepteurs pour les chimiokines soit les CC et les CXC selon leur structure moléculaire et la position des cystéines ³¹. La découverte de l'utilisation de ces récepteurs par le VIH a permis d'expliquer la préférence de certains isolats pour certaines populations de cellules. Selon le co-récepteur utilisé par les virus, ceux-ci furent donc classés en deux groupes, les virus de type X4 utilisent donc le co-récepteur CXCR4 et les virus R5 utilisent le co-récepteur CCR5. Le récepteur CCR5 est

exprimé sur les lymphocytes T CD4+ mémoire, les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les cellules épithéliales ainsi que sur les cellules endothéliales. Le récepteur CXCR4 est exprimé principalement sur les lymphocytes T CD4+ activés. Il est à noter que certains virus sont dits à double tropisme "dual tropic" et peuvent utiliser soit CCR5 soit CXCR4 selon leur disponibilité. La boucle V3, qui est une région hypervariable de la gp120, de par sa charge, va jouer un rôle important dans la détermination du tropisme viral, les boucles chargées positivement ayant une plus grande affinité pour le co-récepteur CXCR4^{32, 33}.

Certains individus expriment une version écourtée de 32 paires de bases, du gène codant pour le récepteur CCR5, ce qui les protège de l'infection par le VIH³⁴⁻³⁶. Cette délétion produit un codon stop prématurément, produisant ainsi une protéine tronquée l'empêchant d'atteindre la surface de la cellule. Les individus homozygotes pour cette délétion sont naturellement résistants à l'infection par des virus VIH de type R5 mais peuvent toutefois être infectés par des virus X4 ou bi-tropiques³⁷. Quant à eux, les individus hétérozygotes peuvent être infectés par des isolats R5 mais l'infection progresse alors beaucoup plus lentement puisque l'expression de CCR5 à la surface des cellules est réduite, augmentant de ce fait leur espérance de vie de façon significative^{34, 38, 39}. Des molécules inhibant la liaison avec le co-récepteur CCR5 ont maintenant été développées comme agents antirétroviraux.

La phase d'attachement du virus à ses récepteurs est donc essentielle pour induire un changement de conformation permettant à la protéine gp41 d'entrer en action et d'entamer le processus de fusion des membranes.

1.3.2.2 Fusion membranaire

La réaction de fusion entre la bicouche lipidique de l'enveloppe virale et la membrane cellulaire va permettre l'introduction de la capsidie contenant le génome viral à l'intérieur du cytoplasme. L'ectodomaine de la gp41 contient une extrémité N-terminale fortement hydrophobe (le peptide de fusion) ainsi que deux régions heptidiques répétées, les hélices N et C. Suite à la liaison de l'enveloppe virale avec le CD4 et le co-récepteur, la gp41 adopte une conformation relaxée et son peptide de fusion s'insère alors dans la membrane cytoplasmique. Les analyses structurales démontrent que l'hélice C reste attachée à la surface du virion alors que l'hélice N est ancrée dans la membrane cellulaire^{40, 41}. La cellule est véritablement harponnée par le peptide de fusion et le repli sur elles-mêmes des hélices C et N va rapprocher la membrane cellulaire de la membrane virale conduisant ultimement à la fusion. Il va alors se créer un pore de fusion qui permettra au virus d'éjecter sa capsidie à l'intérieur de la cellule. Des peptides mimant une région de l'hélice 2 de la gp41 ont été développés comme antirétroviraux pour inhiber le processus de fusion^{42, 43}. Le plus connu est l'enfuvirtide qui est un peptide de 36 acides aminés qui, en se fixant à la région HR2 de la gp41, va l'empêcher de remplir son rôle de fusion des membranes^{44, 45}.

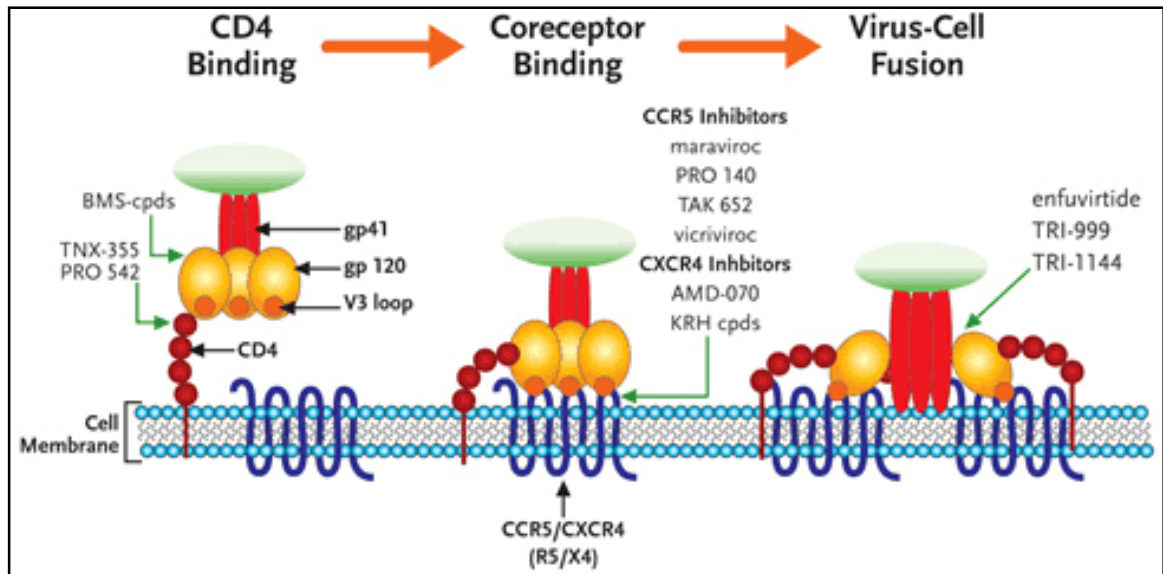


Figure 6 : Illustration schématique de l'entrée du VIH.

La liaison au récepteur, du corécepteur suivi de la fusion membranaire. Identification des différentes molécules inhibitrices de l'entrée. Imagine originale de Robert W Doms, modifiée avec permission par Nelson Vergel.

(http://www.salvagetherapies.org/new_antiretrovirals.htm)

1.3.2.3 Décapsidation, intégration

Une fois la capsid relarguée à l'intérieur de la cellule via le pore de fusion, celle-ci est dégradée, générant alors le complexe de transcription inverse (RTC) comportant le génome viral constitué de deux brins d'ARN, l'amorce tRNA, les enzymes virales transcriptase inverse, intégrase, protéase, ainsi que plusieurs protéines dont la matrice, la nucléocapside et Vpr. Par la suite, le RTC va se lier aux microfilaments d'actine où aura lieu la transcription de l'ARN viral en ADN double-brin par la transcriptase inverse. Plusieurs protéines cellulaires vont avoir un effet sur le RTC dans le cytoplasme. D'abord, la protéine cellulaire APOBEC3G, si présente, va modifier le génome viral par l'hypermutation des cytosines en guanines résultant en virus défectueux⁴⁶. La protéine virale Vif a pour rôle de contrer les effets d'APOBEC3G. La protéine Cy-PA (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) est incorporée dans le virion et se lie à la capsid virale rendant alors le virus résistant à l'action antivirale de TRIM5 α présent dans la cellule nouvellement infectée^{47, 48}.

La transcriptase inverse fut d'ailleurs la cible des premiers médicaments anti-rétroviraux. D'abord les INTI, comme l'AZT et le 3TC, dont le mode d'action repose sur l'introduction par la transcriptase inverse, de nucléotides analogues mais non fonctionnels sur le brin en cours de synthèse stoppant ainsi l'élongation⁴⁹. Les INNTI, tels la NVP et l'EFV, ciblent l'enzyme et vont directement l'inactiver en se liant à son site catalytique rendant alors toute transcription de l'ARN en ADN impossible.

Suite à la transcription, l'ADN viral double-brin va alors former le complexe de pré-intégration (PIC) composé de l'intégrase, des protéines Vpr et RT ainsi que de la matrice. Ce complexe, sous la direction de Vpr, va alors se diriger vers le noyau et comme le VIH peut infecter des cellules n'étant pas en cours de division, le PIC doit donc pénétrer la membrane nucléaire intacte, ce qui représente un défi de taille puisque la taille du PIC est nettement supérieure à celle des pores de la membrane nucléaire. Le PIC va utiliser le réseau de transport offert par les microtubules⁵⁰. C'est alors que l'intégrase va initier son travail d'intégration de l'ADN viral en se liant aux extrémités LTR du provirus et va initier la coupure de deux nucléotides au niveau de l'extrémité 3' du virus. Simultanément, l'intégrase va également couper 5 nucléotides sur l'ADN de l'hôte. L'ADN proviral va ensuite être lié à l'ADN de l'hôte via son extrémité 3'. C'est l'étape du transfert du génome viral "strand transfert". Cette intégration est toutefois partielle puisqu'il faut effectuer une réparation de 5 nucléotides au niveau de la jonction entre les deux génomes, afin de compléter l'intégration⁵¹. C'est probablement les enzymes de réparation de l'hôte qui vont effectuer la correction et ainsi compléter l'intégration du génome viral dans la cellule et plusieurs enzymes semblent être en mesure d'effectuer la réparation comme la polymérase beta, delta et leur co-facteur PCNA ainsi que les ligase I, III et IV en plus de leur co-facteur XRCC4⁵². Plusieurs protéines cellulaires vont jouer un rôle dans l'intégration virale, dont la protéine BAF (barrier-to-auto-integration factor), la protéine LEDGF75, Ini1 et HMGa1. Ces protéines vont stimuler l'intégration et en augmenter l'efficacité quoique leurs mécanismes d'action ne sont pas totalement élucidés⁵³. L'intégration est une étape très délicate et une majorité de provirus ne parviendront pas à s'intégrer : ils vont soit s'auto-intégrer pour former un 1-LTR circle, soit effectuer la

ligation de leur deux extrémités pour former plutôt un 2-LTR circle. Ces deux formes étant des culs-de-sac réplicatifs, ils seront éventuellement dégradés. Il semble également que le virus ne s'intègre pas au hasard dans le génome de la cellule et divers rétrovirus semblent posséder des sites de prédilection. Dans le cas du VIH, le virus s'intègre dans les unités transcriptionnellement actives des gènes⁵⁴ et il n'y aurait pas de préférence entre les introns et les exons⁵¹. Le VIH, contrairement à d'autres rétrovirus, comme par exemple le MLV, est apte à s'intégrer dans des cellules activées ainsi que chez des cellules latentes^{55, 56}. Ainsi, les provirus ayant réussi leur intégration sont donc dépendants du niveau d'activité transcriptionnelle de la cellule résultant en une infection active ou latente⁵⁷.

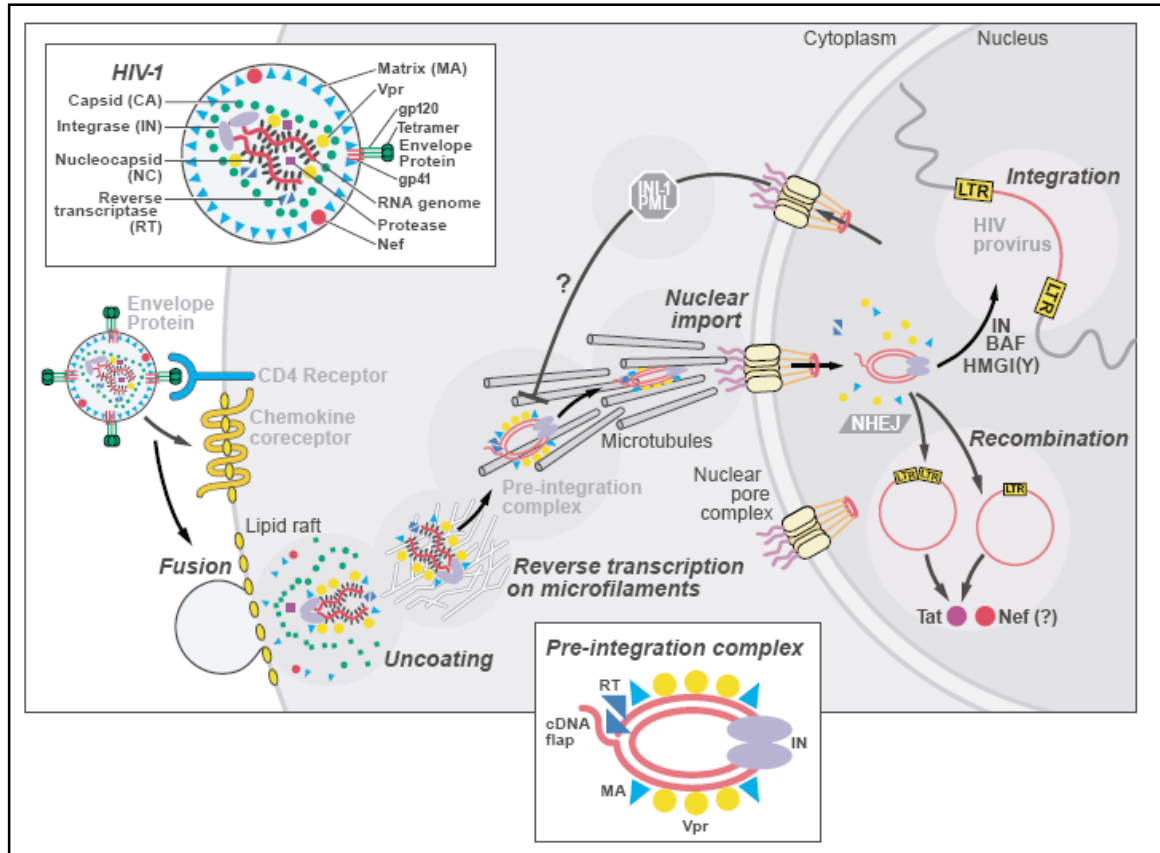


Figure 7: Description des événements suivant l'infection d'une cellule.

Premièrement, interaction entre la gp120, le récepteur CD4 ainsi que le récepteur chimiokine (CCR5 ou CXCR4) permettant la fusion membranaire médiée par la gp41 suivie de la décapsidation. La transcription inverse du génome ARN viral en ADN complémentaire va se produire sur les microfilaments. Le complexe de pré-intégration va se diriger vers le noyau à l'aide du réseau de microtubule où va se produire l'intégration du génome viral à l'intérieur du chromosome de l'hôte⁵⁸.

1.3.2.4 Assemblage

Une fois le provirus intégré au génome cellulaire, la cellule ainsi piégée va produire des ARN viraux encodant toutes les protéines virales structurales, régulatrices et accessoires nécessaires à la réplication virale à partir de l'extrémité 5' du LTR qui va servir, comme pour les eucaryotes, de promoteur de transcription. La transcription débute donc mais se produit très lentement et génère principalement des ARN épissés. Ces petits ARN vont permettre la synthèse de la protéine transactivatrice Tat, qui augmente dramatiquement la transcription des longs ARN viraux^{59, 60}. Vu son rôle très important sur la transcription virale, Tat est l'objet de nombreuses recherches en vue de développer de nouvelles molécules antirétrovirales bloquant son activité. D'ailleurs, en juillet 2008, un essai clinique a débuté en Italie utilisant une protéine recombinante activée de Tat⁶¹.

Suite à la transcription à partir du LTR viral, plus d'une douzaine de transcripts viraux sont produits. D'abord les longs ARN non épissés codant pour les précurseurs des protéines Gag et Gag-Pol. Les ARN partiellement épissés dont la taille est d'environ 5kbp et qui sont responsables de la synthèse des protéines Env, Vif, Vpu et Vpr. Puis, les petits ARN fortement épissés dont la taille se situe entre 1.7 et 2 kbp seront transcrits en protéines Rev, Tat et Nef. La majorité des ARN seront fortement épissés avant même de quitter le noyau vers le cytoplasme, causant ainsi un déficit des longs ARN partiellement et non-épissés codant pour ses protéines structurales. Ce problème est contourné par la protéine virale Rev qui va agir à titre de navette entre le noyau et le cytoplasme afin de sortir les ARN du noyau et éviter ainsi leur épissage^{62, 63}. Une balance doit donc s'établir entre les différents

types d'ARN et leur transport vers le cytoplasme. Une quantité trop importante d'ARN épissé va produire de nombreuses protéines Rev, Tat et Nef et bien que ces protéines régulatrices soient requises, elles ne peuvent, à elles seules, produire des particules virales infectieuses. À l'opposé, des quantités importantes d'ARN non-épissés vont inhiber la synthèse des protéines régulatrices compromettant ainsi fortement la réplication virale.

Ultimement, lorsque toutes les composantes du virus sont synthétisées, le processus proprement dit d'assemblage peut finalement débiter à la membrane plasmique. Ce processus est pris en charge principalement par les différents domaines du précurseur de Gag. D'abord, c'est le domaine de la matrice, situé à l'extrémité N-terminale du précurseur de Gag, de par l'ajout d'acide myristique, qui est responsable de son affinité pour la membrane plasmique. Le domaine de la nucléocapside possède une région ayant une forte affinité avec l'ARN viral permettant ainsi l'encapsulation des deux copies du génome viral⁶⁴. Une fois à la membrane plasmique, le précurseur de Gag va également moduler les interactions Gag-Gag, encapsider les deux copies du génome viral et va s'associer avec Env ainsi que Vpr⁶⁵. La formation de la capsid immature nécessite l'assemblage d'environ 1500 unités de Gag⁶⁶. La protéine d'enveloppe est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux et la gp160 est clivée dans le Golgi par une protéase cellulaire pour générer la gp120 mature, fortement glycosylée, ainsi que la gp41. Ces deux protéines vont s'associer de façon non-covalente et seront ensuite transportées à la surface cellulaire en vue de leur incorporation au virus en cours d'assemblage.

Finalement, les particules virales immatures seront libérées par bourgeonnement. Le bourgeonnement est stimulé par des motifs tardifs dans la protéine Gag, principalement

dans la région de p6. La délétion de p6 est suivie d'une accumulation de particules virales immatures à la membrane plasmique et il semble donc que p6 soit indispensable à la libération des virus ⁶⁷. Trois principaux motifs ont été décrits dans cette région : Pro-Thr/Ser-Ala-Pro [P(T/S)AP], Pro-Pro-x-Pro (PPxY), et Tyr-Pro-xn-Leu (YPxnL). Le motif dominant [P(T/S)AP] va se lier à la protéine cellulaire tsg101 qui est une composante du complexe de protéines ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) dont le rôle est de transporter les protéines vers les vacuoles ^{68, 69}. La protéase virale coupe les polyprotéines Gag et Gag-Pol pour générer des protéines matures. Une cascade de réarrangement à l'intérieur du virus va résulter ultimement en une particule virale capable d'infecter une nouvelle cellule.

Deux autres protéines virales vont avoir un effet sur l'efficacité de réplication virale. La protéine Vif ainsi que la protéine Nef. Vif (facteur viral d'infectivité) est une petite protéine de 192 acides aminés et est présente chez la presque totalité des lentivirus. Des mutations dans Vif vont avoir un effet considérable sur l'infectivité virale. En fait, Vif n'a pas d'effet direct sur le virus mais plutôt sur une protéine humaine ayant une action anti-virale, la protéine APOBEC3G. En absence de Vif, APOBEC3G est introduite dans les virus nouvellement produits et va introduire des changements de nucléotides dans le génome viral inactivant ainsi le virus ⁷⁰⁻⁷². Vif va contrer les effets d'APBOBEC3G en se liant à un résidu d'acide aspartique ce qui va inhiber l'encapsidation d'APOBEC3G. Les virions exempts d'APOBEC3G sont protégés des effets anti-viraux de cette protéine lors de l'infection d'une nouvelle cellule ^{73, 74}.

Une autre protéine virale importante est la protéine Nef qui est une protéine de 27 kdalton unique aux lentivirus de primates. Cette région du génome viral est très conservée suggérant un rôle important de Nef dans l'infectivité. Plusieurs publications ont démontré la faible pathogénicité des virus SIV et VIH déficients pour la protéine nef comparés avec des virus de type sauvages⁷⁵⁻⁷⁷. Nef diminue l'expression de plusieurs récepteurs à la surface cellulaire tels : le CD4⁷⁸, CD8⁷⁹, CD28⁸⁰ ainsi que CMH I⁸¹ et II⁸². Ces récepteurs étant essentiels au bon fonctionnement du système immunitaire, des modifications au niveau de leur expression vont avoir un impact important sur les réponses immunitaires. De plus, la diminution de l'expression du CD4 va favoriser le bourgeonnement et le relargage des virus à la surface des cellules, augmentant ainsi l'infectivité virale⁵⁰. Nef peut également altérer l'état d'activation de la cellule ainsi que la signalisation cellulaire⁸³.

1.3.2.5 L'infection primaire

1.3.2.5.1 Les différents stades de l'infection

Un contact infectieux avec le VIH se produit généralement au niveau des muqueuses gastro-intestinales ou génitales. Quoique les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 sont utilisés par le VIH pour infecter une cellule, les virus utilisent presque exclusivement le récepteur CCR5 lors de l'infection primaire⁸⁴. Au fil de la progression de la maladie, l'évolution d'espèces virales utilisant le récepteur CXCR4 s'observe chez environ la moitié des individus⁸⁵⁻⁸⁸. Or, la muqueuse gastro-intestinale est le plus grand organe lymphoïde du corps humain et environ 60% de la population de lymphocytes s'y trouve^{89,90}. Ces cellules expriment fortement CD4, CCR5 ainsi que les marqueurs d'activation HLA-DR et CD69 et sont donc très susceptibles à l'infection par le VIH⁹¹. Toutefois, une étude récente suggère qu'une majorité de lymphocytes se trouveraient plutôt dans la rate⁹². Quoiqu'il en soit, suite à un contact contaminant, ce sont les cellules de la muqueuse gastro-intestinale qui sont généralement les toutes premières cellules qui vont rencontrer les virus transmis. Il va s'ensuivre une infection massive et une réplication virale importante et, plus de 50% des cellules exprimant CD4 et CCR5 seront infectées et détruites dans les deux à trois premières semaines suivant l'infection. D'autres populations cellulaires sont présentes dans les muqueuses et sont susceptibles à l'infection. C'est le cas des cellules de Langerhans, qui sont des cellules dendritiques cutanées. Ces cellules sont très nombreuses dans les muqueuses cervicales et vaginales et expriment un fort niveau de récepteurs CD4 et de CCR5^{93,94}. Les cellules dendritiques, quant à elles, sont des cellules présentatrices d'antigènes et le VIH peut s'y attacher via le récepteur cellulaire DC-SIGN^{95,96}. Les

[Type text]

cellules dendritiques sont de grandes voyageuses de par leurs fonctions de présentation d'antigène et, vont malencontreusement propager l'infection vers d'autres organes lymphatiques comme les ganglions lymphatiques, le thymus et la rate.

Suite à cette dissémination virale, la virémie devient alors très importante au niveau sanguin et le sujet infecté est fortement contagieux. Toutefois, l'infection primaire passe souvent inaperçue. Les symptômes sont souvent discrets tels fièvre, adénopathies, maux de gorge, éruptions cutanées, douleurs musculaires, diarrhée et maux de tête et se résorbent généralement en quelques semaines. Souvent ces symptômes vont être associés à tort à une mononucléose ou à une grippe. Selon la classification de Fiebig, la primo-infection peut-être divisée en six stades ⁹⁷: D'abord le stade I se caractérise par l'apparition d'une charge virale supérieure à 100 copies d'ARN par ml de plasma et se produit généralement dans les 10 à 17 jours suivant la transmission. Durant cette période, le virus va se répliquer massivement et le sujet est alors fortement infectieux. En quelques jours, la détection de l'antigène p24 va également être positive (stade II) et la charge virale est nettement supérieure (parfois jusqu'à 5-6 log d'ARN viral). Puis les premières réponses immunitaires de type IgM vont se produire et pourront être détectées à l'aide des tests de nouvelle génération dont la sensibilité est accrue : on parle alors de séroconversion (stade III). Environ 30 jours suivant l'infection, le test western blot, qui met en évidence les protéines virales, est indéterminé (stade IV). La charge virale est relativement stable durant les stades II à IV, puis, approximativement 3 mois suivant l'infection, on observe une diminution de la charge virale ainsi qu'un résultat du test western blot positif (stade V). Le

dernier stade peut être subdivisé en infection récente puis, ultérieurement, en infection chronique (figure 8).

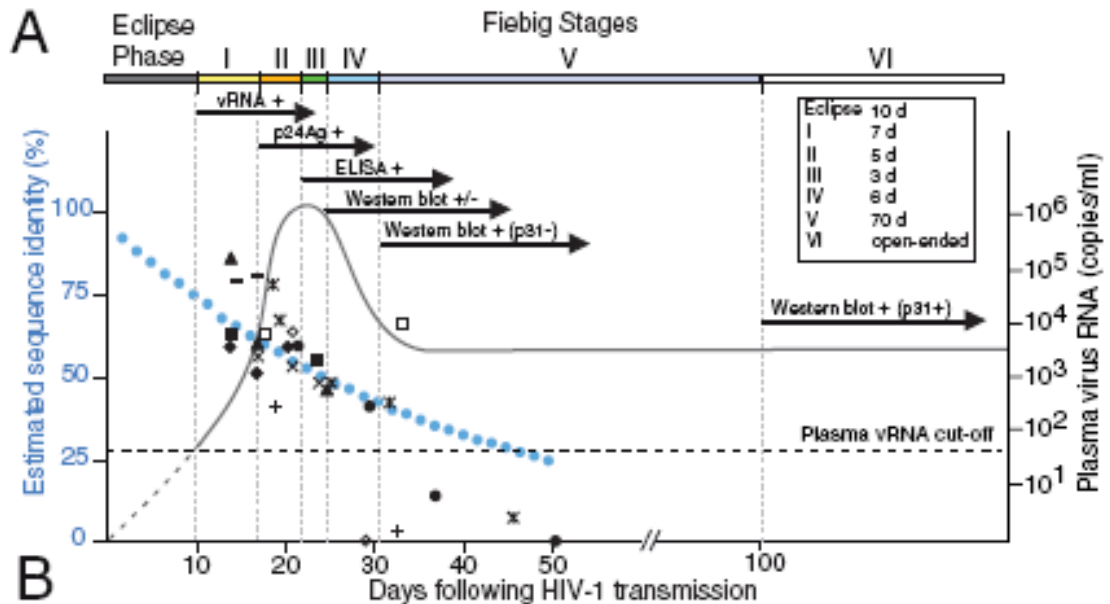


Figure 8. Stade de l'infection par le VIH⁹⁸

Évolution de la diversité du gène *env* du VIH-1 en relation avec les stades de l'infection tels que décrits par Fiebig. (A) Stades de Fiebig⁹⁷ en corrélation avec les résultats de tests laboratoire lors du suivi de l'infection par le VIH.

1.3.2.5.2 Les réponses immunitaires face à l'infection par le VIH

Le système immunitaire va donc détecter l'infection par le VIH et y réagir de plusieurs façons soit via le système immunitaire inné constitué des phagocytes et des natural killers (NK), ainsi que par le système immunitaire adaptatif composé des lymphocytes T auxiliaires et des lymphocytes T cytotoxiques.

1.3.2.5.2.1 Immunité innée

L'immunité innée, constituée par les phagocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans, natural killers (NK) sera la première à détecter l'infection et à tenter de la contrer ou de la limiter dans l'attente des premières réponses immunitaires spécifiques. Au contraire de l'immunité adaptative, l'immunité innée n'est pas spécifique au VIH, n'utilise pas d'immunoglobulines de surface, de récepteur T ni de molécules du CMH pour le reconnaître et n'a pas de fonction mémoire. L'immunité innée va plutôt reconnaître des substances très conservées sur la majorité des micro-organismes comme, par exemple, les résidus de mannose. En premier lieu, les cellules de Langerhans présentes dans la muqueuse vaginale et le prépuce⁹³, les cellules T+ $\gamma\delta^+$ retrouvées dans l'épithélium vaginal et rectal ainsi que les macrophages, les cellules dendritiques et les NK dans les tissus sous-épithéliaux rencontreront le virus⁹⁹. L'activation de ces populations cellulaires va stimuler la production de différentes cytokines telles : RANTES, MIP- α , MIP-1 β qui, en se liant au récepteur CCR5 ou en le sous-régulant, vont protéger les cellules de l'infection¹⁰⁰. Aussi, l'interaction entre les récepteurs de mannose à la surface des macrophages et des cellules dendritiques et les glycanes de la protéine de l'enveloppe virale va induire la sécrétion de l'interféron de type 1 α et β ¹⁰¹. En plus d'inhiber la réplication virale, l'interféron va stimuler la production d'interféron γ , ce qui a pour effet de promouvoir le développement de la réponse immune adaptative spécifique, en particulier les cellules Th1, et éventuellement induire une réponse des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques^{102, 103}. Finalement, l'INF- α empêche l'apoptose des lymphocytes T activés¹⁰⁴.

1.3.2.5.2.2 Immunité adaptative

Lorsqu'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) rencontre un antigène, elle l'internalise soit par phagocytose ou endocytose, où il sera dégradé en peptides de 8 à 10 acides aminés de longueur par des protéases cellulaires. L'antigène dégradé est ensuite associé au CMH de classe II et acheminé vers la membrane cellulaire. La CPA migre ensuite vers les ganglions lymphatiques où elle va présenter son antigène aux cellules T auxiliaires (T helper). Les lymphocytes T auxiliaires, via leurs récepteurs TCR et CD4, vont reconnaître le complexe antigène-CMH de classe II, ce qui va entraîner la libération de cytokines ayant pour effet d'activer les diverses composantes du système immunitaire. Les lymphocytes T auxiliaires sont une composante très importante du système immunitaire : d'abord, ils sont responsables de l'activation des lymphocytes B et de la production d'anticorps. Ils vont également promouvoir la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques et vont maximiser l'activité des macrophages et phagocytes.

Les individus infectés par le VIH développent de fortes réponses CTL spécifiquement dirigées contre les différentes protéines virales tant structurelles qu'accessoire¹⁰⁵. Les CTL possèdent deux types de réponses anti-VIH. Elles vont reconnaître, à la surface d'une cellule infectée, un peptide viral lié au CHM de classe I et initier la lyse de cette cellule et peuvent donc éliminer une cellule infectée avant que celle-ci n'ait eu la possibilité de relarguer de nouveaux virions. De ce fait, ils ont une influence certaine sur le contrôle de la réplication virale^{106, 107}. De plus, les lymphocytes cytotoxiques peuvent inhiber la réplication du VIH par la sécrétion de chimiokines comme la MIP-1- α , MIP-1 β et

[Type text]

RANTES. Ces chimiokines vont se lier au co-récepteur CCR5 ou CXCR4 à la surface du lymphocyte CD4⁺ et vont ainsi protéger la cellule de l'infection en bloquant l'accès du virus au récepteur¹⁰⁸.

Les allèles de HLA (antigènes des leucocytes humains) sont très diversifiés chez l'homme et, selon leur séquence, vont présenter différents antigènes à leur surface. Chaque cellule présente trois différents isotypes HLA de classe I à sa surface : HLA-A, B et C. On retrouve également trois isotypes pour le HLA de classe II : HLA-DR, DQ et DP. Selon qu'un individu est homozygote ou hétérozygote pour ses allèles HLA, six à douze différents HLA seront exprimés à la surface cellulaire. Les individus étant homozygotes vont présenter évidemment une variété plus réduite de peptides viraux que les personnes hétérozygotes et un répertoire plus vaste de peptides est associé avec une progression plus lente de l'infection¹⁰⁹⁻¹¹¹. De plus, les HLA ne sont pas tous égaux et certains d'entre eux seraient associés à une progression plus lente de la maladie, comme les HLA B27, B57, B58 alors que HLA B35 ont été associés à une progression plus rapide¹¹²⁻¹²¹. Plusieurs études ont tenté d'établir une association entre l'intensité des réponses CTL et le contrôle de la réplication virale sans toutefois parvenir à démontrer ce lien sans équivoque¹²²⁻¹²⁷. Par contre, d'autres études démontrent aussi qu'au-delà de leur intensité, certaines réponses CTL sont associées à une réduction de la charge virale, particulièrement les réponses dirigées envers Gag-Pol alors que celles visant Env ainsi que les protéines accessoires ou régulatrices seraient associées avec une charge virale plus importante¹²⁸⁻¹³¹. Le rôle de certains haplotypes de HLA-II dans la progression de l'infection n'est pas aussi clair que pour les HLA-I. Certaines études ont également démontré une progression plus lente chez

les individus porteurs des haplotypes DRB1*13-DQB1*06¹³²⁻¹³⁴. Par contre, deux autres études n'ont pas permis de conclure à un rôle quelconque de ces allèles sur la progression^{116, 135}.

Les individus VIH+ vont aussi développer des anticorps dirigés contre différentes protéines virales. Les premiers anticorps généralement détectés sont dirigés contre les protéines p24 et p17 encodées par le gène *gag* et plusieurs de ces anticorps vont se lier à des débris viraux et n'auront évidemment pas un effet antiviral important. Par contre, certains anticorps dirigés contre l'enveloppe vont neutraliser le virion avant son entrée dans la cellule¹³⁶⁻¹³⁸. Ces anticorps sont appelés anticorps neutralisants. Plusieurs anticorps neutralisants ont été identifiés à ce jour. Certains ciblent la région hypervariable V3 et, bien qu'ils possèdent une activité antivirale, leur activité est limitée puisque cette région est sujette à des changements fréquents d'acide aminé¹³⁹. Quatre autres anticorps ont été identifiés, deux contre la gp120 (b12 et 2G12) et deux contre la gp41 (2F5 et 4E10)¹⁴⁰⁻¹⁴⁴. Bien que présents chez la majorité des patients, les anticorps neutralisants demeurent relativement peu efficaces à contrôler la réplication virale puisque le virus va évoluer plus rapidement que la réponse humorale de l'hôte. Il semble donc que seule une minorité de patients parviennent à contenir la réplication virale suite à de hauts titres d'anticorps neutralisants¹⁴⁵.

L'ensemble de ces mécanismes immuns vont conduire à une diminution partielle de la charge virale puis un phénomène de plateau va apparaître reflétant l'équilibre créé entre le nombre de cellules nouvellement infectées/détruites et le nombre de nouvelles cellules

régénérées par le système immunitaire. Généralement, le système immunitaire réussit à contrer la majorité des infections. Toutefois, dans le cas de l'infection par le VIH, les cellules particulièrement importantes au contrôle de l'infection, les lymphocytes T auxiliaires, sont directement ciblées et seront détruites par le virus. Il y a donc une diminution lente mais constante du nombre des cellules du système immunitaire engendrant du même coup une réduction des fonctions immunologiques. Le système immunitaire a la capacité de produire de nouveaux lymphocytes T principalement par deux mécanismes. En premier lieu, suite à l'activation d'une cellule, il va s'ensuivre une expansion clonale de cette cellule, c'est-à-dire la production de cellules identiques et ayant donc la même spécificité que la cellule-mère. Une fois le pathogène contrôlé, les cellules vont adopter un phénotype mémoire. Bien que ce phénomène soit efficace pour les cellules CD8, ce n'est pas le cas pour les cellules CD4 dont la majorité vont être détruites, soit par des effets cytotoxiques ou par apoptose, et seul un faible pourcentage vont réverter en cellules-mémoire¹⁴⁶. Ce mécanisme assure donc la durabilité des réponses déjà présentes, mais ne permet pas de produire des cellules T ayant de nouvelles spécificités. Au début de l'infection, lorsque le répertoire d'antigènes reconnus est relativement intact, l'expansion clonale a des effets bénéfiques. Par contre, plus ce répertoire devient restreint, plus l'expansion clonale a un effet moindre. Le deuxième mécanisme permettant de générer de nouvelles cellules T se produit dans le thymus. C'est dans cet organe que sont produites les cellules T naïves qui vont éventuellement se différencier en lymphocytes CD4 ou CD8. Ce répertoire cellulaire est construit principalement durant l'enfance et la capacité du thymus à produire de nouvelles cellules diminue avec l'âge^{147, 148}.

1.3.2.6 L'infection chronique

L'état d'équilibre entre le nombre de cellules infectées détruites par les CTL et le nombre de nouvelles cellules infectées va perdurer de nombreuses années mais va toutefois entraîner le système immunitaire dans un état d'activation perpétuel contribuant à la perte de lymphocytes CD4 et l'augmentation de la charge virale. Lorsque les CD4 ne sont plus qu'à 350-500 cellules/mm³, le système immunitaire est endommagé et environ la moitié des réserves immunologiques ont déjà été détruites, rendant l'hôte susceptible à diverses infections mineures comme l'herpès simplex, des condylomes et des infections fongiques telle la candidose ^{149, 150}. Au-dessous de 200 cellules/mm³, le patient devient particulièrement vulnérable à des infections opportunistes sérieuses et potentiellement mortelles ainsi que des cancers. Parmi ces maladies on retrouve la pneumonie causée par *Pneumocystis jirovecii*, la toxoplasmose, la cryptococcose, la tuberculose, l'infection par le cytomégalovirus, le sarcome de Kaposi, des lymphomes ainsi que des atteintes neurologiques ¹⁵⁰.

1.3.2.7 Les réservoirs

Lorsque les combinaisons puissantes de médicaments antirétroviraux ont été introduites au milieu des années 1990, le taux de mortalité et de morbidité de l'infection par le VIH a chuté de façon dramatique dans les pays industrialisés ¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Il fut alors permis d'envisager la possibilité de parvenir à l'éradication du virus chez les patients répondant

[Type text]

bien au traitement ¹⁵⁵. En effet, après l'initiation du traitement, la charge virale devient généralement inférieure à 50 copies d'ARN viral par millilitre en quelques semaines et une amélioration des comptes de CD4 est observée. Malheureusement, cet espoir d'éradication a été remis en question suite à de nombreuses études. D'une part, on observe, chez la majorité des patients traités, d'occasionnelles augmentations (blips) de la charge virale au-dessus de la limite de détection ¹⁵⁶. D'autre part, des techniques de détection du virus plus sensibles ont permis d'observer qu'il se produit de la réplication virale à faible niveau chez la plupart des patients (seuil 1 copie d'ARN viral/ml) ¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Aussi, lorsqu'un patient interrompt sa médication, un rebond spectaculaire et rapide de la charge virale est observé et atteint généralement des niveaux comparables aux niveaux pré-thérapie ^{161, 162}. Ces données ont donc suggéré la présence de réservoirs viraux chez les patients sous thérapie antirétrovirale.

Finzi et al. ont alors avancé l'hypothèse que des cellules lymphocytes T CD4 mémoires pourraient servir de réservoir et ils ont démontré la présence de virus capables de provoquer une infection dans une population pure de cellules CD4 quiescentes chez tous les patients testés, malgré les antirétroviraux ¹⁶³. Ces cellules, bien qu'infectées, ne produisent pas de virus et permettent donc à celui-ci de perdurer et d'échapper aux réponses immunitaires en plus de le protéger de l'action des antirétroviraux ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. En effet, le virus étant au repos, les cellules infectées ne vont pas exprimer à leur surface, d'antigènes viraux permettant d'identifier ces cellules comme étant infectées et celles-ci ne seront donc pas reconnues et détruites par les CTL. De plus, le virus étant inactif, sa polymérase n'est pas sollicitée et les INNTI et INTI n'auront pas d'effet sur ce virus. Idéalement, il faudrait des molécules

permettant d'atteindre les virus intégrés dans une cellule et en étant de latence. Sachant que la demi-vie de cette sous-population de cellules CD4 est d'environ 44 mois, et que ces dernières dérivent de cellules précédemment activées et permissives à l'infection ayant adoptées un phénotype mémoire, l'espoir d'éradiquer le virus par un traitement prolongé s'est évanoui. En effet, la quantification longitudinale du nombre de virus capables de provoquer une infection par million de CD4+ mémoire (IUPM) chez ces patients a permis d'observer que la diminution du nombre de particules infectieuses était très faible. Selon les estimations, plus de 60 années de traitement optimal seraient requises afin d'éradiquer le virus en supposant qu'il n'existe pas d'autres compartiments cellulaires ou sanctuaires où le virus pourrait persister ¹⁶⁷. Plusieurs autres types cellulaires comme les cellules dendritiques ^{168, 169}, les macrophages ^{161, 170}, les cellules CD8 ¹⁷¹, les lymphocytes B et les cellules NK ¹⁷² servent probablement de réservoir. De plus, certains tissus et organes pourraient également servir de réservoir viral puisqu'il est connu que les diverses drogues utilisées dans le traitement contre l'infection au VIH-1 n'y pénètrent pas bien et/ou que les réponses immunitaires de l'hôte dans ces compartiments sont restreintes ^{173, 174}. Les organes lymphoïdes tels : les tissus gastro-intestinal et respiratoire, la rate et les ganglions lymphatiques ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷, le système nerveux central ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ ainsi que le tractus génital ¹⁸¹⁻¹⁸⁴ sont probablement impliqués dans le maintien du réservoir viral.

Plusieurs études ont obtenu des résultats contradictoires quant à la taille et à la demi-vie du réservoir (6.4 à 44.2 mois) ¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Reconnaisant l'importance de ces réservoirs, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées afin de cibler les réservoirs. D'abord par l'intensification du traitement ¹⁸⁸ mais aussi par l'activation forcée des cellules mémoire avec des molécules telles l'acide valproïque ^{189, 190} et/ou l'interleukine-2 ¹⁹¹ tout en

[Type text]

maintenant les traitements antirétroviraux de base afin de protéger les cellules saines d'une éventuelle infection. Jusqu'à présent, ces stratégies ne se sont pas avérées efficaces. Aussi, puisque le réservoir se met en place dès le début de l'infection, l'initiation rapide du traitement suivant la séroconversion pourrait permettre de diminuer le réservoir viral des cellules du sang périphérique ainsi que dans le GALT "gut-associated lymphoid tissue" ^{192, 193}. Chung et al. ont aussi démontré que l'initiation précoce du traitement a un effet bénéfique et permettrait d'éradiquer complètement ce réservoir viral en 7.7 années de traitement ¹⁹⁴. Plusieurs modèles mathématiques récents visant à déterminer la période de traitement nécessaire pour éradiquer le virus de toute cellule mémoire infectée semblent également démontrer qu'il serait possible avec un traitement précoce et agressif, de purger les cellules mémoire ¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Comme plusieurs patients ayant initié leur traitement lors de la primo-infection vont bientôt atteindre ce plateau de 8 années de traitement, il serait très intéressant d'observer la taille des réservoirs chez ces patients et de suivre leur évolution. Dernièrement, l'équipe du Dr. Sékaly a aussi démontré que les cellules T mémoire, plus particulièrement la sous-population centrale mémoire et mémoire transitoires, composaient plus de 80% de la taille des réservoirs et que l'initiation précoce du traitement limitait la taille des réservoirs ¹⁹⁹.

Aussi, l'initiation précoce du traitement pourrait, en plus de diminuer la taille des réservoirs viraux, diminuer le degré de diversification présent dans les réservoirs. Il y a cependant des arguments contre l'initiation précoce du traitement antirétroviral. En effet, les traitements sont associés à de nombreux effets secondaires, à de la toxicité à long terme ainsi qu'à un coût appréciable. Puisque la majorité des patients peuvent maintenir une santé normale

pendant plusieurs années suivant l'infection par le VIH, il pourrait être avantageux d'attendre une détérioration du décompte CD4 avant d'initier le traitement. Cela pourrait également retarder l'apparition de mutations de résistance.

En plus des réservoirs, il existe aussi des compartiments viraux et/ou sanctuaires. Alors que les réservoirs vont restreindre la réplication virale et préserver du virus capable de réplication durant de très longues périodes, les compartiments anatomiques, quant à eux, vont permettre la réplication virale. Toutefois, il n'y a que très peu d'échanges entre certains compartiments anatomiques et les cellules circulantes. Quant au sanctuaire, il s'agit d'un site où on observe une faible pénétration des médicaments et le virus peut s'y répliquer de façon plus active²⁰⁰. À noter que les réservoirs, compartiments et sanctuaires ne sont pas mutuellement exclusifs. C'est le cas, par exemple, du liquide céphalo-rachidien où l'évolution virale peut être indépendante de d'autres sites anatomiques et où la concentration de drogue peut être sous-optimale. À ce jour, l'éradication virale n'a été rapportée que chez un seul patient, celui-ci ayant reçu une greffe de moëlle osseuse provenant d'un individu porteur de la mutation delta 32 sur le récepteur CCR5²⁰¹. Bien que plusieurs stratégies ont été développées afin d'éradiquer le virus et que la qualité de vie des personnes atteintes s'est nettement améliorée, la guérison est, à ce jour, toujours inatteignable.

1.4 Diversité génétique

1.4.1 Origine du VIH et de sa diversité génétique

1.4.1.1 Origine du VIH-zoonose virale

Peu après l'isolation du VIH-1 en 1983 puis du VIH-2 en 1985, divers rétrovirus ayant une organisation génomique similaire furent isolés chez plusieurs espèces de singes africains. Ces virus sont aujourd'hui mieux connus sous le nom de virus de l'immunodéficience simienne (SIV) et n'entraînent aucune pathologie chez leur hôte naturel mais provoquent un syndrome apparenté au SIDA lorsqu'ils sont inoculés à d'autres espèces de singes ²⁰². C'est d'ailleurs une caractéristique fondamentale des virus passant d'une espèce vers une autre et qu'on regroupe sous le terme de zoonose.

Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer l'origine de l'infection du VIH chez l'homme. La théorie la plus largement acceptée est celle du “ chasseur malchanceux ” qui se serait infecté accidentellement par du sang d'un animal infecté par le SIV ²⁰³. Les études phylogénétiques démontrent clairement que plusieurs événements de transmission inter-espèces des primates vers l'homme se sont produits, introduisant ainsi dans la population humaine deux virus génétiquement distincts, le VIH-1 et le VIH-2 ²⁰⁴.

Bien que présent dans la population humaine depuis moins d'un siècle, le virus du VIH a développé plus de 30% de variation génétique durant ce court laps de temps ²⁰⁵. En comparaison, l'ensemble des variations génétiques du virus de l'influenza A depuis environ 2000 ans est équivalent à la variation du VIH chez un seul individu (approximativement 5%) ²⁰⁶ (figure 9).

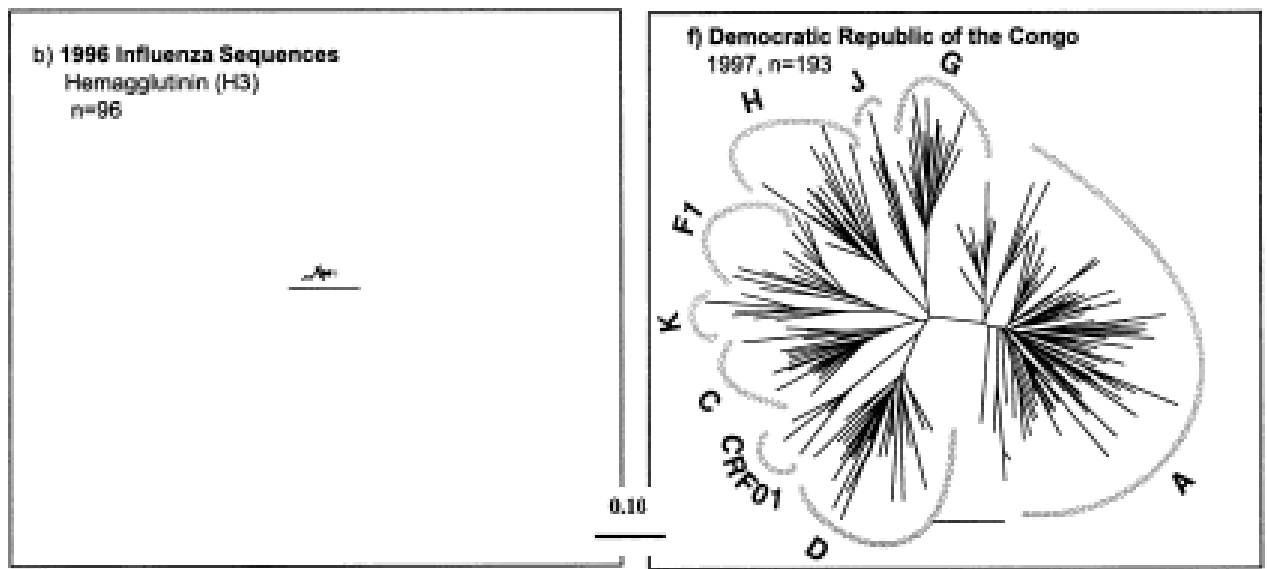


Figure 9 : Comparaison de l'évolution virale du virus de l'influenza et du VIH durant une année

B) Arbre phylogénétique construit à partir des 96 domaines HA1 de l'influenza humain H3N2 isolée en 1996. F) Arbre basé sur les séquences de C2V5 de virus isolé en 1997 en République Démocratique du Congo ²⁰⁶.

1.4.1.2 VIH-2

Bien que le VIH-1 et le VIH-2 causent essentiellement la même pathologie, soit l'immunodéficience, des différences majeures existent entre ces deux virus. D'abord pour le VIH-2, la contamination vers l'homme se serait produite à partir de singes Mangabé (SIV_{SM}) entre 1940 et 1945²⁰⁴. L'infection par le VIH-2 est beaucoup plus rare et est confinée principalement en Afrique de l'Ouest. De plus, la progression de la maladie est beaucoup plus lente que pour le VIH-1 et ce virus se transmet plus difficilement. La charge virale chez les individus infectés par le VIH-2 est nettement plus faible que chez les individus infectés par le VIH-1, ce qui pourrait expliquer la plus lente progression de la maladie et son plus faible pouvoir infectieux²⁰⁷⁻²¹². Le VIH-2 est divisé en 7 groupes (A-G) mais la quasi-totalité des infections sont de type A ou B²¹³.

1.4.1.3 VIH-1

Les études phylogénétiques de virus VIH-1 trouvés chez l'homme et de virus SIV_{CPZ} chez des primates suggèrent qu'au moins trois événements indépendants de transmissions se sont produits entre les années 1910 et 1950 à partir de chimpanzés^{205, 214}. Ces événements ont conduit à l'apparition de trois groupes M (major), O (outlier) N (non-major et non-outlier) et O (outlier). Plus de 90% des infections sont de groupe M. En 2008, une étude parue dans la revue scientifique Nature démontre que le VIH était présent chez l'humain en 1881

Le groupe M est sous-divisé en 9 sous-types soit : A, B, C, D, F, G, H, J et K ²¹⁶. La variation génétique à l'intérieur d'un même sous-type se situe entre 15% et 20% alors qu'elle atteint de 25 à 35% entre les sous-types ²¹⁷. De plus, certains clades sont également sous divisés en sous sous-types. C'est le cas pour le sous-type A qui est divisé en quatre sous-clades, A1, A2, A3 et A4 ainsi que pour le sous-type F séparé en deux sous-clades soit F1 et F2 ²¹⁸.

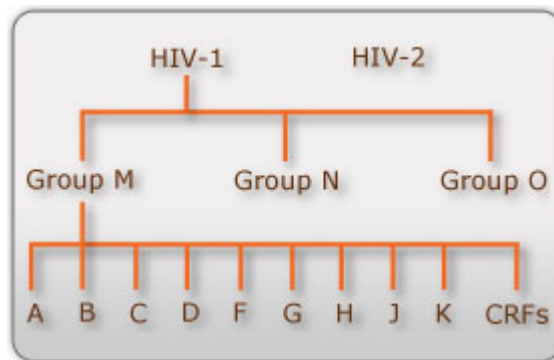


Figure 10 : Représentation schématique des sous-types du VIH-1 et VIH-2

Source : <http://www.avert.org/hivtypes.htm>

La recombinaison génétique est un autre processus contribuant à l'apparition de diversité virale. Ce phénomène se produit lorsqu'une personne est infectée par deux sous-types différents et que ces deux virus se multiplient dans une même cellule, résultant en un virus hybride représentant une mosaïque des deux virus présents (voir figure 11). Lorsque cette forme recombinante est retrouvée chez au moins trois autres personnes non-épidémiologiquement liées, on la décrit alors comme étant un CRF (circulating recombinant form), alors que si elle n'est retrouvée que chez un seul individu on parle alors de URF (unique recombinant form). Dans les dernières années, l'accès au séquençage complet des génomes viraux à partir d'une seule copie de virus (single genome sequencing)

a permis de documenter une panoplie de nouveaux CRF et URF ainsi que leur distribution géographique, illustrant bien la complexité et la diversité de l'épidémiologie du VIH à travers le monde ²¹⁶. À ce jour, plus de 43 CRF ont été décrits.

Name: CRF02_AG Reference strain: IBNG Subtypes: A, G



Figure 11 : Représentation schématique de la forme recombinante CRF02_AG

Source : <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

1.4.2 Distribution géographique et prévalence des sous-types VIH-1

Le sous-type A est présent en Afrique de l'Est et Centrale ainsi qu'en Asie de l'Est et en Europe de l'Ouest et il est responsable d'environ 12% des infections par le VIH dans le monde. Bien que le sous-type B soit le plus répandu géographiquement, il est surtout observé en Amérique, en Europe ainsi qu'en Australie et ne représente qu'environ 10% des cas dans le monde. Au contraire, le sous-type C à lui seul, est responsable de la moitié des infections ²¹⁶ et il se retrouve dans les régions du monde les plus touchées par l'épidémie, c'est-à-dire, l'Afrique de l'Est, l'Afrique du Sud et l'Inde. Le sous-type D se trouve principalement en Afrique de l'Est et serait l'ancêtre africain du sous-type B, les deux clades étant génétiquement similaires. Le clade D est associé à une progression rapide de la

maladie et ce virus utiliserait le co-récepteur CXCR4 très tôt au cours de l'infection ^{219, 220}. Heureusement, la prévalence de ce sous-type serait à la baisse ²²¹. Le sous-type E retrouvé surtout au sud-est de l'Asie, a été reclassé comme étant plutôt une forme recombinante AE et non un sous-type pur E après le séquençage complet de son génome. Ce sous-type est maintenant identifié comme CRF01_AE ^{222, 223}. Cette forme recombinante est relativement répandue et représente 5% des infections VIH dans le monde. On retrouve le sous-type G en Afrique de l'Ouest et il représente environ 6% des infections. La forme recombinante CRF02_AG est également fréquente dans cette région (environ 5% des cas). Finalement, les sous-types F-H-J-K sont peu répandus et représentent moins de 1% des cas, alors que les autres formes recombinantes représentent moins de 0.1% des cas chacune.

1.4.3 Évolution virale et apparition des variantes

Il existe donc une panoplie de sous-types du virus du VIH-1, eux-mêmes composés de centaines d'isolats distincts. Donc, des patients infectés avec un virus de même sous-type vont posséder des virus différents, c'est ce qu'on appelle la diversité inter-patient. Toutefois, suite à la transmission, l'évolution virale va se poursuivre puisque le virus transmis est soumis à diverses pressions et il doit s'y adapter afin d'assurer sa survie. Aussi, puisque l'infection par le VIH perdure durant de nombreuses années et que les pressions de sélection de l'hôte vont se modifier au fil du temps, le virus va constamment devoir s'y adapter. Nous allons donc observer, chez un individu donné, une population virale hétérogène composée de virus distincts, ou variantes ^{224, 225}. L'ensemble des variantes virales retrouvées chez un même individu est regroupé sous l'appellation diversité

[Type text]

intra-patient. Divers mécanismes tant au niveau du virus lui-même qu'au niveau de l'hôte infecté, mais aussi quant à l'environnement dans lequel le virus va évoluer, vont moduler l'évolution du virus chez un individu.

1.4.3.1 Facteurs Viraux

1.4.3.1.1 Erreurs de la transcriptase inverse

La transcriptase inverse (RT) est responsable de la réplication du génome viral. Cette enzyme possède deux activités, une d'ADN polymérase et une de RNase H. Comparativement aux polymérases cellulaires, la polymérase virale n'a pas de mécanisme de réparation des erreurs de transcription et, par conséquent, sa fidélité est réduite. C'est ainsi qu'entre 5 et 10 erreurs se produisent par cycle de réplication, générant de multiples variantes virales ¹³. Durant les premiers stades de l'infection par le VIH, la réplication virale est à son niveau le plus élevé, soit environ 10^{10} virus par jour ²²⁶. Bien évidemment, le nombre de virus mutants ainsi générés est directement proportionnel au niveau de réplication chez un patient. Toutefois, ces mutations sont de type ponctuel, c'est-à-dire qu'elles apparaissent au hasard et de façon aléatoire sur la totalité du génome viral. De ce fait, certaines mutations peuvent conférer un avantage pour le virus et peuvent être sélectionnées et devenir une proportion importante de la population virale chez un patient. Au contraire, ces mutations ont également la possibilité de nuire au virus introduisant des

codons stop prématurément ou en modifiant des acides aminés essentiels et ainsi produire des virus défectueux.

1.4.3.1.1.2 Recombinaison virale

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, des événements de recombinaison peuvent se produire lors du cycle répliatif et produire des virus hybrides. Or, ce mécanisme est présent chez tous les patients bien que les effets de la recombinaison soient nettement plus visibles chez un patient infecté par deux virus de sous-types distincts²²⁷⁻²³⁰. Ainsi, chez un patient possédant diverses variantes, celles-ci pourront s'échanger par recombinaison des portions de leur génome et ainsi générer une nouvelle variante représentée par les deux variantes parentales.

1.4.3.1.1.3 La capacité répliative (fitness)

Le fitness est la capacité d'un virus à se répliquer dans un environnement donné. Il s'agit généralement du corps humain mais à plus petite échelle, la capacité répliative d'un virus peut varier à l'intérieur du même organisme selon la sous-population cellulaire ou l'organe étudié. Plusieurs facteurs viraux, environnementaux et propres à l'hôte vont avoir un effet sur la capacité répliative du virus et, par conséquent, sur la diversité virale. Diverses études ont récemment démontré un lien entre la capacité répliative du VIH, la diversité, la recombinaison ainsi que la progression de la maladie²³¹⁻²³³. Le virus le mieux adapté ou le

[Type text]

plus "fit" à son environnement possède donc un avantage sur les autres variantes présentes. Par contre, il est essentiel pour le virus de limiter les dégâts causés par sa présence chez l'hôte afin de maximiser sa survie ainsi que ses chances de transmission ²³⁴. Néanmoins, certaines souches sont plus virulentes que d'autres et la virulence a un effet certain sur la progression de la maladie. C'est le cas, entre autres, des virus ayant une protéine Nef non-fonctionnelle et qui sont associés à une progression plus lente de la maladie ²³⁵⁻²³⁷. Aussi, les virus de type X4 sont beaucoup plus "fit" et virulents *in vitro*, que les virus de type R5 ²³². Par contre, puisque les premières cellules rencontrées chez un hôte lors de la transmission expriment très fortement CCR5 et non CXCR4, ces virus n'ont pas la capacité de se répliquer dans ces cellules et ce sont plutôt les virus R5 qui vont initier l'infection et prédominer tout au long de la maladie. Les virus de type X4 ou bi-tropiques vont apparaître chez environ 40 à 50 % des cas en cours d'évolution, possiblement en lien avec la destruction de sous-populations cellulaires ²³⁸. Chez un hôte donné, la population virale est composée de plusieurs variantes possédant une capacité répliquative propre. La sélection positive implique donc que certaines variantes seront plus aptes que d'autres à se répliquer dans un environnement alors que la sélection négative va éliminer les virus les moins "fit".

1.4.3.1.1.4 Sites de glycosylation

La glycosylation consiste à lier de façon covalente une molécule de carbohydrate sur une protéine via l'acide aminé asparagine (N). Pour qu'une asparagine soit glycosylée, il est nécessaire qu'elle soit dans une séquence d'acide aminé précise (N-X-S/T), consistant en

n'importe quel acide aminé (X) suivi exclusivement d'une sérine (S) ou d'une thréonine (T). Toutefois, il n'y aura pas de glycosylation si une proline (P) est intégrée ou suit immédiatement la séquence N-X-S/T ^{239, 240}. L'enveloppe du VIH est une des protéines les plus glycosylées connues et ces sucres représentent plus de 50% de son poids moléculaire ^{22, 241}. La présence de glycans sur la face exposée de la gp120 va former un bouclier qui va entraîner une diminution de son pouvoir immunogène en plus de protéger le virus des anticorps neutralisants en leur bloquant l'accès à leurs sites d'action ²⁴²⁻²⁴⁵. Lors de la transmission vers un nouvel hôte, le virus transmis possède généralement moins de glycans à la surface de son enveloppe et ce virus est généralement sensible aux anticorps neutralisants qui, à ce moment, sont absents chez l'hôte nouvellement infecté ²⁴⁶. Au fil de l'infection, on observe une augmentation du nombre de glycans ainsi que des changements au niveau de leur position particulièrement dans la protéine Env ^{240, 247, 248}. La sensibilité aux anticorps neutralisants lors de la primo-infection pourrait être une opportunité intéressante pour le développement de vaccins ²⁴⁶.

1.4.3.1.1.5 Longueur des boucles V1/V2, V3, V4/V5

En plus des sites de glycosylation, l'enveloppe virale est caractérisée par cinq régions hypervariables (V1 à V5) flanquées de régions constantes (C1-C5). Ces régions forment la face externe de l'enveloppe virale ²⁰. Les changements dans la boucle V3 sont associés à l'utilisation du co-récepteur CCR5 ou CXCR4 alors que les régions V1/V2 modulerait les mouvements de V3 ²⁴¹, alors que V4-V5 sont situées sur l'autre face de la gp120 et ne sont pas impliquées dans les interactions avec le récepteur ²⁰. Les boucles V1/V2 et V4/V5

[Type text]

sont très variables en séquence ainsi qu'en longueur et sont fortement glycosylées²⁴⁹⁻²⁵¹. Lors de la transmission d'un virus vers un nouvel hôte, le virus transmis posséderait des boucles plus courtes que le virus du donneur²⁴⁶. Tout comme l'ajout de glycans sur l'enveloppe virale, des mutations, insertions ou délétions dans les boucles V1, V2 et V5 ont été associées à une résistance aux anticorps neutralisants (Nabs) en masquant les épitopes viraux^{247, 252, 253}.

1.4.3.2 Facteur de l'hôte

1.4.3.2.1.1 Pression du système immunitaire

En plus de la capacité de mutation propre au virus, plusieurs mécanismes chez l'hôte infecté vont également générer des mutations chez le virus. En effet, lorsque débute l'infection, le sujet infecté n'a pas encore produit de réponse immunitaire contre le virus et celui-ci va se répliquer à sa guise. Par contre, à mesure que vont se développer les réponses immunitaires de l'hôte, le virus va devoir se modifier afin d'échapper à ces réponses. Plusieurs types de réponses immunitaires seront produites afin de contrer l'infection par le VIH.

1.4.3.2.1.2 Les anticorps neutralisants/CMH de classe II

Les CPA vont capturer l'antigène au lieu de sa pénétration, le dégrader et via leur molécule CMH II, vont le présenter aux cellules T auxiliaires. Cette présentation va déclencher la sécrétion de plusieurs cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13) stimulant alors la production d'anticorps par les lymphocytes B. Les anticorps dirigés contre l'enveloppe virale vont empêcher le virus de pénétrer à l'intérieur de la cellule, le neutralisant ainsi. Par contre, le virus a développé plusieurs mécanismes lui permettant d'échapper à l'action des anticorps neutralisants. D'abord, de par sa conformation, l'enveloppe virale limite l'accessibilité des épitopes reconnus par les Nabs²¹. Aussi, cette protéine étant fortement glycosylée diminue drastiquement son pouvoir immunogène²⁴¹. De plus, cette région virale étant très variable et sujette à des mutations fréquentes, ce bouclier va continuellement se modifier au fil de l'infection afin de contrer les diverses attaques immunitaires^{246, 254, 255}. Finalement, le VIH via les protéines Nef et Tat peut altérer le mécanisme de présentation de l'antigène en diminuant l'expression des molécules du CMHII, causant ainsi un dysfonctionnement des fonctions immunitaires.

1.4.3.2.1.3 Les lymphocytes cytotoxiques/CMH de classe I

Les cellules infectées présentent à leur surface, un épitope viral d'une longueur d'environ 8-10 acides aminés associé à une molécule du CMH de class I. Ainsi marquées, ces cellules seront détruites par l'action des lymphocytes T cytotoxiques. Les isotypes de HLA

vont présenter différents épitopes et ainsi, des mutations virales dans ces régions pourront permettre au virus d'échapper à la présentation par le CMH de classe I et assurer sa survie. En 1991, Phillips et al. ont caractérisé une mutation dans *gag* permettant au virus d'échapper à la reconnaissance de cet épitope par le CHMI et ainsi échapper à l'action des CTL ²⁵⁶. Depuis, plusieurs autres études ont confirmé la présence de mutation d'échappement aux CTL ainsi que la transmission de ces variantes vers un nouvel hôte ²⁵⁶⁻²⁶⁷. Comme pour les Nabs, la réponse cytotoxique de l'hôte va forcer la sélection de quasi-espèces virales ayant muté au niveau des épitopes reconnus par le système immunitaire.

1.4.3.2.1.4 Facteur de restriction-APOBEC

Durant la transcription inverse, APOBEC3G va éditer l'ARN viral en permutant les nucléotides les cytosines (C) en uracil (U) sur le brin en cours de transcription résultant ainsi en une hypermutation de nucléotide G en A sur l'ADN viral ²⁶⁸. Cette activité a pour but d'introduire des mutations létales chez le virus soit en produisant un codon stop ou en modifiant un acide aminé essentiel. Ce mécanisme se produit au hasard sur le génome et lorsqu'il se produit à des endroits non-critiques pour la survie du virus, il va y avoir apparition de variantes virales portant la signature de l'action d'APOBEC3G ^{269, 270}.

1.4.3.3 Pression de sélection des ARV

1.4.3.3.1.1 Principes et définition

L'environnement dans lequel évoluera le virus va également avoir un effet sur sa diversification et le facteur environnemental le plus étudié est certainement l'effet des traitements antirétroviraux. Lorsqu'un traitement antirétroviral est initié, celui-ci va avoir un effet important sur la réplication virale. De ce fait, une forte pression de sélection sera exercée sur le virus et des variantes ayant la capacité de se répliquer en présence de traitement auront un avantage évolutif certain. Des concentrations sous-inhibitrices d'ARV, secondaires à des problèmes d'adhérence ou d'absorption par exemple, vont permettre l'émergence de virus résistants ²⁷¹⁻²⁷⁶.

Depuis les premier cas d'infection par le VIH il y a 25 ans, 25 molécules antivirales ont été approuvées pour le traitement ²⁷⁷. La première molécule qui fut introduite sur le marché en 1987 fut l'AZT ⁴⁹. Toutefois, avec son usage en monothérapie, la résistance a rapidement été décrite ²⁷⁸. Aujourd'hui, la monothérapie a été abandonnée et la thérapie consiste maintenant en des associations de plusieurs molécules ce qui a permis de diminuer drastiquement la morbidité et la mortalité liées au VIH. Toutefois, des mutations se produisant dans les gènes codant pour les protéines ciblées par les médicaments, que ce soit la transcriptase inverse, la protéase, l'intégrase ou l'enveloppe ont été identifiées et sont responsables d'échecs thérapeutiques ²⁷⁹. Des profils de résistance ont été décrits pour chacune de ces molécules et sont régulièrement mis à jour ²⁸⁰. De plus, certaines mutations sont associées à de la résistance croisée et peuvent conférer de la résistance à toute une classe d'antirétroviraux ²⁸¹⁻²⁸⁴. C'est le cas de la voie des TAM (Thymidine Analogue-

associated Mutations) qui est constituée des mutations M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q et qui confère de la résistance à tous les INTI. Les TAM sont divisés en deux voies, les TAM 1 qui consistent des mutations : M41L, L210W et T215Y et les TAM2 composés des mutations: D67N, K70R, K219Q et T215F. La thérapie étant disponible depuis plus longtemps dans les régions où l'on retrouve presque exclusivement des virus de sous-type B, les mutations associées à de la résistance à ce sous-type ont été sujettes à de nombreuses études.

Le traitement antiviral est maintenant disponible dans presque toutes les parties du monde où prédomine l'infection avec des sous-types non-B. Des mutations associées à de la résistance ont été observées dans toutes ces régions mais les voies de résistance chez les sous-types non-B sont moins connues.

1.4.3.3.1.1 Résistance naturelle aux ARV

La grande variabilité du VIH est un défi important pour la mise au point de médicaments antirétroviraux puisque ceux-ci doivent agir sur un maximum d'isolats distribués à travers différents sous-types. Bien que la majorité des cas d'infection au VIH se retrouve sur le continent africain, les médicaments sont générés dans les pays du Nord et sont élaborés à partir de souches appartenant au sous-type B qui sont très peu répandues dans les régions les plus touchées par la pandémie. De plus, le génome du sous-type B diffère considérablement de celui des autres sous-types et des formes recombinantes retrouvées en Afrique et en Asie où se trouvent la majorité des personnes infectées. Cette variabilité

pourrait certainement avoir un impact sur les voies de résistances aux ARV. D'ailleurs, chez certains sous-types, on observe des polymorphismes naturels qui peuvent être associés à une diminution de la sensibilité de ces virus à certains antirétroviraux. Par exemple, des observations *in vivo* et *in vitro*, ont mis en évidence la résistance naturelle des virus appartenant au groupe O ainsi que les souches de VIH-2 aux INNTI de par la présence de cystéine ou d'isoleucine à la position 181 plutôt que d'une tyrosine^{285, 286}. On observe aussi un polymorphisme naturel chez le sous-type C à la position G190A/S qui joue un rôle dans la résistance aux INNTI^{287, 288}. Une autre étude a démontré une susceptibilité réduite à AZT, 3TC, ddI et NVP pour le clade D et une sensibilité similaire des clades A, B, C et CRF01_AE²⁸⁹. Le sous-type G possède naturellement la mutation V82I lui conférant une sensibilité réduite à SQV, RTV et à IDV²⁹⁰. Alors que beaucoup d'efforts sont déployés afin d'améliorer l'accès aux antirétroviraux dans les pays en développement, un très grand nombre de personnes infectées avec des sous-types non-B vont initier un traitement dans les prochaines années. Il est donc important de comprendre les polymorphismes naturels des sous-types non-B et leur impact sur les différents patterns mutationnels sous la pression de sélection des antirétroviraux.

1.4.3.3.1.2 Développement de résistance chez les sous-types non-B

Malgré l'importante diversité génétique entre les différents sous-types, il semble que les polymorphismes associés à de la résistance et à l'échec thérapeutique soient relativement stables d'un sous-type à un autre²⁹¹⁻²⁹³. Par contre, les séquences du gène RT des sous-types non-B disponibles dans les bases de données ne représentent qu'à peine 10% des

séquences du sous-type B disponibles ²⁹⁴. Les polymorphismes naturels retrouvés chez les non-B aux sites associés à des mutations de résistance, pourraient, suivant l'exposition aux ARV, influencer le type de mutations observé et avoir un impact sur les voies de sélection de certaines mutations ²⁹⁵. Bien que plusieurs mutations majeures associées à de la résistance chez les sous-types B ont également été observées chez les sous-types non-B, quelques nouvelles mutations ont été décrites chez les non-B.

D'abord pour les résistances aux INTI, une nouvelle voie associée aux TAM a été décrite chez des patients infectés par le sous-type C au Botswana ²⁹⁶. Cette voie est composée de deux mutations appartenant aux TAM 2 soit : 67N et 70R ainsi que la mutation 215Y qui est associée aux TAM1. Pourtant, cette nouvelle voie n'a pas été retrouvée lors d'autres études réalisées sur le sous-type C en Inde et en Afrique du Sud ^{287, 297, 298}. Une autre étude a également démontré une incidence plus élevée des TAM chez le sous-type CRF06_cpx que pour CRF02_AG ²⁹⁹. L'étude de Montes et al. parue en 2004 recense une plus faible prévalence des mutations M41L, L210W et, dans une moindre mesure, de la mutation T215Y chez les sous-types non-B ³⁰⁰. Le sous-type C aurait tendance à sélectionner plus rapidement la mutation K65R, conférant un niveau de résistance élevé au TDF et intermédiaire à plusieurs autres INTI ^{301, 302}. Cette mutation serait également moins présente chez les patients infectés par le sous-type A lors de l'échec thérapeutique ³⁰³. Notons aussi que la forte fréquence pré-traitement versus post-traitement des mutations E203D/K/V/N/A, H208Y et H221Y retrouvée chez le sous-type C suggère un rôle probable de ces mutations dans la résistance aux INTI ³⁰⁴. Finalement, des mutations observées sur le codon 211 plutôt que sur le codon 210 ont été rapportées au Brésil chez des isolats

appartenant au sous-type F exhibant de la résistance aux INTI ³⁰⁵. Une autre publication fait état de profils de résistance différents pour les sous-types B, F et C au Brésil ³⁰⁶

Au niveau des INNTI, plusieurs études ont confirmé l'importance de la mutation V106M chez les sous-types non-B suite au traitement avec NVP ou EFV ^{287, 288, 296, 307}. Pour le sous-type C, la mutation V108I est également associée avec l'apparition d'une sensibilité nettement réduite (entre 10 et 1000 fois) à tous les INNTI suivant l'exposition à l'EFV ²⁸⁸. Lors d'une étude menée en Ouganda où des femmes enceintes furent traitées par une dose unique de NVP, l'émergence de virus résistants fut observée à une fréquence plus élevée chez les femmes infectées par le sous-type C que chez celles infectées par le sous-type A ou D ³⁰⁸⁻³¹⁰. Une autre étude issue de la collaboration de plusieurs groupes a observé une fréquence plus importante que chez le sous-type de mutation présente sur le codon 35 pour les sous-types A et G, 98 pour les sous-types C, G ainsi que CRF02_AG, et 106 pour le sous-type C ^{311, 312}. Dans cette même étude, certains codons étaient, au contraire, moins fréquemment mutés chez les non-B que chez le sous-type B.

Chez les isolats appartenant au clade B, la résistance au NFV est reliée à la sélection de la mutation D30N, pourtant ce sont plutôt les mutations N88S et L90M qui semblent être sélectionnées chez les sous-types A, F, G ainsi que pour le CRF01_AE ³¹³⁻³¹⁵. La mutation M89I/V a été identifiée chez les clades C, F et G exclusivement ³¹⁶. La mutation V82M a également été observée uniquement chez le sous-type G ³¹⁷.

Étant donné la mise en place massive de programmes visant à améliorer l'accès aux thérapies antirétrovirales dans les pays en voie de développement, il est important de documenter l'impact de cette diversité virale sur les profils de résistance aux antirétroviraux. Bien qu'il existe une variabilité virale extrême dans ces régions et que cette diversité est associée à des voies de résistance différentes, la majorité des patients répondent bien au traitement, ce qui permet l'amélioration de la qualité de vie des personnes atteintes en plus de diminuer les risques de transmission. Toutefois, à mesure que les traitements seront disponibles dans les pays en développement, il est fort probable que ces régions seront également confrontées à l'émergence de la résistance. Ceci pourrait avoir des conséquences encore plus importantes que dans les pays industrialisés puisque l'accessibilité aux traitements de troisième ligne est limitée. Nous pouvons imaginer l'impact dramatique que l'émergence de virus résistants pourrait avoir dans les régions à ressource limitée où un seul régime de deuxième ligne est disponible.

1.4.3.3.1.3 La résistance primaire aux antirétroviraux

La résistance primaire se définit comme la résistance aux antirétroviraux survenant chez un patient n'ayant jamais été traité. Elle est la conséquence de la transmission d'une souche résistante d'un patient à un autre. Comme l'AZT a été la première molécule disponible pour le traitement de l'infection à VIH, les premiers cas de transmission de résistance ont été décrits comme étant associés à cette molécule³¹⁸. Or depuis ce temps, ce phénomène s'est étendu à toutes les classes de molécules antirétrovirales³¹⁹. Les programmes de

prévention de la transmission mère-enfant avec une dose unique de NVP sont aussi susceptibles de favoriser la transmission de virus résistants.

Une revue des différentes études évaluant la prévalence de la résistance primaire a démontré d'énormes variations selon la région géographique ³²⁰. Un taux de 2.1% a été rapporté au Burkina Faso alors qu'un taux de 24% a été observé chez des patients séroconvertisseurs de New York ³²¹. Les traitements antirétroviraux étant disponibles depuis de nombreuses années dans les pays développés, il n'est pas surprenant d'observer une résistance primaire plus importante que dans les pays où les patients infectés sont exposés depuis moins longtemps aux traitements antirétroviraux, tel que le Burkina Faso.

Finalement, lorsque des mutations qui n'étaient pas présentes avant le début du traitement se produisent chez un individu durant le cours du traitement, on parle alors de résistance secondaire.

1.4.3.4 Maladie sous-jacente

La présence d'infection sexuellement transmise aurait aussi une influence sur le degré de diversité virale retrouvée, particulièrement chez les femmes. En effet, les femmes ayant une infection de la muqueuse vaginale lors d'une relation sexuelle à risque seraient non seulement plus susceptibles d'être infectées mais également, de recevoir du partenaire plusieurs variantes virales ³²². Toute atteinte pouvant avoir un effet sur le système immunitaire, comme une infection avec un co-pathogène, est susceptible de diminuer la

[Type text]

capacité du système immunitaire de contrôler la virémie, d'augmenter la charge virale (même temporairement) et est donc susceptible d'entraîner l'apparition de nouvelles variantes.

1.4.3.5 Compartiment/Réservoir

Un autre facteur ayant un effet sur la diversité virale est le site de réplication du virus. Comme les virus contenus à l'intérieur d'un compartiment sont isolés, ils ne sont pas soumis aux mêmes pressions de sélection. La concentration de drogue ou l'action du système immunitaire peuvent ne pas être optimaux selon le compartiment et ces virus ont tendance à évoluer de manière distincte²⁰⁰.

1.4.4 Étude de la diversité

D'abord, la diversité virale est le décompte de toutes les différences entre des séquences génétiques. Afin de bien saisir ce concept, on peut illustrer la diversité dans un contexte plus familier, par exemple, le parc automobile où l'on pourrait définir la diversité comme étant les différentes couleurs des voitures. La diversité est souvent représentée par une valeur, soit en pourcentage soit en nombre de différences par 100 unités (nucléotides ou acides aminés).

Il existe plusieurs algorithmes permettant de calculer la diversité. Le plus simple est de calculer le nombre de disparités entre des séquences. Ce calcul peut s'effectuer autant sur

les nucléotides que sur les acides aminés. Puisque plusieurs séquences de nucléotides peuvent conduire à la synthèse du même acide aminé, nous comprendrons que la diversité calculée avec les acides aminés est généralement inférieure à la diversité calculée à l'aide des nucléotides. L'algorithme de Jukes et Cantor (1969) est un modèle de substitution très simple qui permet de calculer le nombre de différences entre des séquences³²³. Le modèle de Felsenstein (1981) est une modification de Jukes-Cantor et qui n'assume pas que la fréquence des nucléotides est uniforme³²⁴. Ce modèle est biologiquement plus près de la réalité, particulièrement chez les vertébrés dont le génome est riche en C-G. D'autres algorithmes vont permettre de donner un score plus élevé à des types de mutations particuliers. Par exemple, un changement de nucléotide n'ayant aucun effet sur l'acide aminé synthétisé (mutation silencieuse ou mutation synonyme) obtiendra un score plus faible qu'une mutation ayant pour effet de modifier l'acide aminé (mutation non-silencieuse, ou non synonyme). L'algorithme de Kimura (1980)³²⁵ ainsi que l'algorithme HKY (Hasegawa, Kishino et Yano, 1985)³²⁶ vont octroyer un score plus élevé à une mutation de type transversion (purine ↔ pyrimidine) qu'à une transition (purine ↔ purine ou pyrimidine ↔ pyrimidine). Il est également possible de donner plus de poids à des mutations se trouvant à un site particulier (mutations associées à la résistance) ou dans une région particulière sur un gène (mutation dans une région constante versus mutation dans une région très variable). Il existe donc diverses méthodes afin d'évaluer le niveau de polymorphismes entre des séquences. Il est toutefois important de noter que peu importe la méthode choisie, les résultats devraient illustrer une même tendance.

1.4.4.1 La distance/divergence

La distance ou divergence est une notion différente de la diversité mais y est toutefois fortement liée. Sans diversité, il ne peut y avoir de distance. La divergence est le calcul qui permet de nous renseigner sur la distance d'un variant viral par rapport à un autre, généralement, la souche ancestrale (most recent common ancestor ou MRCA). Si la diversité nous renseigne quantitativement sur le nombre de différences entre deux séquences, la divergence nous informe plutôt sur l'ordre dans lequel se sont produites les dites mutations. Aussi, lorsque des mutations se produisent au hasard et qu'elles ne produisent pas d'avantages marqués chez les souches possédant ces nouvelles mutations, la diversité virale augmente mais la divergence reste constante. Alors que des variantes possédant une mutation leur permettant de résister à la présence de médicaments, par exemple, pourraient être moins diversifiées puisqu'elles possèdent toutes la même mutation mais seront plus éloignées de la souche ancestrale. Si on reprend notre exemple des voitures où les différentes couleurs représentent la diversité, les voitures hybrides, même si elles sont toutes de la même couleur, se trouveraient à une distance plus éloignée des voitures à essence que des voitures à essence de couleurs différentes.

Comme pour la diversité, la divergence peut être calculée à partir des nucléotides ou des acides aminés. Aussi, les mêmes algorithmes sont utilisés pour déterminer la distance. Plus les calculs seront effectués tôt dans l'évolution, plus la diversité et la divergence posséderont des valeurs similaires; la divergence augmentera au fil de l'apparition des nouvelles générations. De façon générale, la distance génétique est illustrée par la construction d'arbres phylogénétiques. Ces arbres sont similaires aux arbres généalogiques

représentants les familles mais sont souvent représentés horizontalement plutôt que verticalement et la longueur de la branche représente sa distance par rapport aux autres éléments alors que la disposition verticale n'a pas de signification. Il existe plusieurs formes, comme par exemple la forme circulaire, rectangulaire ou radiale. La forme choisie n'a pas d'influence sur les liens entre les différents éléments de l'arbre.

1.4.4.2 Diversité intra-patient et évolution de la maladie

Plusieurs études suggèrent qu'une seule ou quelques variantes virales sont transmises vers le nouvel hôte ³²⁷⁻³³³. La population virale lors de la primo infection est généralement homogène (moins de 1% de variation génétique pour le gène de l'enveloppe), et ce, particulièrement chez l'homme. Cette faible diversité génétique a été également observée chez des patients dont le partenaire source était pourvu d'une panoplie de variantes suggérant ainsi la présence d'une barrière de sélection lors de la transmission ³²⁹⁻³³¹. Cette pression de sélection lors de la transmission a aussi été observée chez les enfants nés de mères infectées par le VIH. En effet, la majorité des enfants présentaient un nombre inférieur de quasi-espèces que chez la mère ^{334, 335}. Toutefois, ce goulot d'étranglement ne semble pas prévenir aussi fortement la transmission de multiples variantes chez les femmes africaines puisque plus de 60% des femmes possédaient de multiples variantes très tôt dans l'infection selon plusieurs études ³³⁶⁻³³⁸. Sagar et al. ont démontré en 2004 que les femmes ayant une infection génitale et/ou utilisant des contraceptifs hormonaux seraient plus à risque d'être infectées par plusieurs variantes virales, et ce, indépendamment du sous-type viral ³²². Cette même équipe a aussi étudié la transmission de multiples variantes chez les

[Type text]

utilisateurs de drogues intraveineuses et bien que les résultats obtenus soient à la limite du seuil de signification dû au faible nombre de participants, ils suggèrent que ces individus seraient également plus à risque d'être infectés par plusieurs variantes lors de la transmission³²².

Il est important de noter que l'infection par diverses variantes a été reliée à une progression plus rapide de la maladie, par une diminution marquée des CD4 ainsi qu'une charge virale plus élevée³³⁸. D'une manière générale, les études citées précédemment ont toutes observé, lors de la primo-infection, une population virale homogène lorsqu'une ou deux variantes virales sont transmises et une population plus hétérogène lorsqu'il y a transmission de multiples variantes. Toutefois, une autre étude semble infirmer ces résultats. Il semblerait plutôt que plusieurs particules infectieuses seraient transmises et que l'une d'elles, de par son potentiel répliatif supérieur, donnerait faussement l'apparence d'une infection homogène³³⁹. Puisque le gène de l'enveloppe est directement lié à l'entrée du virus dans la cellule, il est aussi possible que la pression de sélection lors de la transmission agisse fortement sur ce gène et que l'apparence de population virale homogène soit uniquement associée à cette région^{330, 331}. Sachant que le risque d'infection par acte sexuel est faible, (environ 0,3%), il est fort probable qu'une seule variante soit transmise. Plus récemment, Keele et al. ainsi que Haaland et al. ont démontré, que dans 90% des cas, un seul variant était transmis^{98, 340}. Haaland et al. ont de plus démontré que tous les partenaires ayant de multiples variantes avaient également une infection génitale inflammatoire (inflammatory genital infections)³⁴⁰.

Une fois le virus transmis chez un nouvel hôte, les premières mutations vont se produire, majoritairement par erreur de la transcriptase inverse. Puisque la réplication virale est élevée au début de l'infection, plusieurs variantes seront ainsi générées. Toutefois, ces erreurs se produisent au hasard sur toute la longueur du génome viral et ne sont aucunement associées à une pression de sélection. De ce fait, l'analyse phylogénétique de ces séquences devrait produire un arbre avec une conformation de type "étoile", c'est-à-dire que toutes les séquences sont à égale distance de la souche ancestrale⁹⁸. Par conséquent, la séquence consensus de ces virions devrait permettre d'identifier la ou les variantes transmises. Lorsque les premières réponses immunitaires vont se manifester, environ 3 semaines post-infection, celles-ci vont exercer une pression de sélection sur le virus. Le virus doit s'adapter pour survivre et la réponse immunitaire va ainsi sculpter l'évolution virale. Il y aura donc apparition de variantes possédant certaines mutations leur permettant de déjouer les réponses immunitaires (ajout de sites de glycosylation sur l'enveloppe masquant les sites d'action des Nabs, changement d'acide aminés sur les épitopes reconnus par les CTL). Ces mutations n'étant pas distribuées au hasard mais sur des sites précis, l'analyse phylogénétique démontre alors l'apparition de lignées distinctes. Au fil de l'infection, on peut observer 3 différentes phases de diversification des séquences²⁵⁰. D'abord, il y a augmentation graduelle mais continue de la diversité virale ainsi que de la distance génétique. Pour le gène de l'enveloppe, il est possible d'observer une augmentation de la divergence d'environ 1% par an pendant la phase asymptomatique jusqu'à un plateau d'environ 5%²⁵⁰. Puis, plusieurs années post-infection, il se produit une stagnation dans la diversité alors que la distance de la souche ancestrale continue de se creuser. Cette phase est associée à l'émergence de virus avec un tropisme X4 dans 50%

des cas^{87, 88, 341}. Puis finalement, lors de la dernière phase, une stagnation de la divergence et une diminution de la diversité sont observées. Généralement, cette phase coïncide avec un déclin marqué du décompte CD4 chez ces individus.

1.5 Hypothèses

Nous avons formulé l'hypothèse qu'un traitement antirétroviral initié précocement pourrait, en plus de contrôler la réplication virale et maintenir un décompte CD4 dans les valeurs normales, limiter la taille des réservoirs ainsi que la diversification virale. Le fait de posséder une population virale homogène pourrait être bénéfique pour ces patients puisque la variabilité extrême du VIH est un obstacle majeur à l'éradication. Elle permet l'échappement au système immunitaire, compliquant la mise au point d'un vaccin efficace. De plus, l'émergence de virus résistants limite les options thérapeutiques.

Dans ce contexte, sachant que les traitements antirétroviraux sont de plus en plus disponibles dans les régions où l'épidémie de VIH est principalement due à des sous-types non-B, nous avons voulu vérifier si des polymorphismes présents chez les sous-types non-B pourraient avoir un impact sur l'efficacité du traitement. Il existe relativement peu d'études sur les voies de résistance des CRF, tels que les sous-types CRF_02_AG et CRF06_cpx ainsi que sur les sous-types plus rares comme le sous-type K. Ces polymorphismes pourraient diriger l'évolution virale dans des voies génétiques différentes sous la pression de sélection des médicaments et résulter en des canevas de mutations de résistance différents. Bien qu'il soit bien essentiel d'améliorer l'accès aux molécules antirétrovirales dans les pays en voie de développement, il est également indispensable de documenter l'émergence de la résistance et de préparer l'accessibilité aux molécules de deuxième et troisième lignes.

2. Résultats

2.1 Effet du traitement antirétroviral sur la diversité virale durant la primo-infection

Dans cet article, nous avons caractérisé l'évolution virale du gène d'enveloppe chez 18 patients ayant récemment obtenu un diagnostic d'infection par le VIH. De ce groupe, 9 ont décidé d'initier un traitement antirétroviral alors que 9 ont choisi de s'en abstenir. Bien que plusieurs articles ont déjà traité de la diversité virale du gène de l'enveloppe, il existe relativement peu d'études sur l'évolution virale durant la première année suivant l'infection et l'effet du traitement sur la diversité n'est pas bien documenté. Ce premier article tente donc d'apporter de nouvelles données quant à l'effet du traitement précoce sur l'évolution virale ainsi que sur la taille des réservoirs viraux.

Cet article a été soumis à AIDS Research and Human Retroviruses. Juin 2009

Dans cet article, Annie Chamberland avec l'aide de Mohamed Sylla a procédé à l'isolation des PBMC, à leur mise en culture, à l'évaluation de la p24, extraction ARN/ADN, dilutions en série, amplification par RT/PCR ainsi qu'au séquençage. Elle a ensuite procédé à l'édition et à l'alignement des séquences afin de générer les calculs sur la diversité virale et les analyses phylogénétiques. Les analyses statistiques ont été effectuées par l'étudiante avec la collaboration du service de statistique de l'Université de Montréal

Annie Chamberland a également rédigé le manuscrit sous la supervision de sa directrice Dre. Cécile Tremblay.

Effect Of Antiretroviral Therapy On HIV-1 Genetic Evolution During Acute Infection.

Running Header: Viral Evolution During HIV-1 Acute Infection

Annie Chamberland^{1,5*}, Mohamed Sylla^{1,5}, Mario Legault,² Mohamed Rachid Boulassel², Jean-Guy Baril³, Pierre Côté^{1,3}, Réjean Thomas⁴, Benoît Trottier^{1,4}, Danielle Rouleau^{1,5}, Jean-Pierre Routy² and Cécile Tremblay^{1,5**} for the Investigators of the Primary HIV-Infection Cohort of Montreal

¹Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Montréal, Canada. ²McGill University Health Centre, Montréal, Canada, ³Clinique Médicale du Quartier Latin, Montréal, Canada, ⁴Clinique Médicale l'Actuel, Montréal, Canada, ⁵Université de Montréal, Montréal, Canada

*264 René-Lévesque Est, Room PEA1054, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1. Telephone: 514-890-8000 poste 35249, Fax: 514-412-7377. **264 René-Lévesque Est, Room PEA1054, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1.

**Hôpital Hôtel-Dieu, Pavillon Jeanne-Mance, bureau 7-355, 3840 rue St-Urbain, Montréal, Qc H2W 1T8, Telephone: 514-890-8000 poste 14613, Fax: 514-412-7234.

Annie Chamberland

Work supported by the Réseau du Fonds de la Recherche en Santé du Québec FRSQ-SIDA. CT and JPR are Clinician Scientists receiving support from FRSQ

Words count 3165- abstract 254

Abstract

Objective(s): It is unknown whether early antiretroviral treatment during acute HIV-1 infection has a beneficial effect. We evaluated the impact of early therapy on viral genetic evolution in a cohort of subjects during primary HIV-1 infection in Québec.

Methods: 18 patients recently infected with HIV-1 were selected from the Montreal HIV-1 primary infection cohort, 9 initiated antiretroviral therapy after enrolment and 9 remained untreated. Clonal analyses of envelope sequences obtained from plasma and from PBMC at baseline and after one year of follow-up were evaluated for diversity and phylogenetic analysis. Replication-competent viruses (RC) were measured at both time-points using an ultrasensitive PBMC culture technique.

Results: Viral variants were homogeneous at baseline (0.19%) and diversity remained low after one year of follow-up in both groups (0.29%). However, a significant increase in viral diversity was observed in the untreated group after one year of follow-up for the V4 ($p=0.046$) and V5 ($p=0.046$) domains of gp120 and a trend towards an increase in diversity was observed in C2V5 and V3.

Conclusions: Genetic diversity during primary infection remains low through the first year of infection. Early treatment contributed to a decrease in viral RC from PBMCs and to maintaining homogeneous viral populations in the viral reservoir. These findings may have relevance for the rational design of HIV specific immunotherapeutic strategies.

Keywords: HIV-1, Sequence diversity, Treatment, Acute infection

Introduction

HIV-1 evolves rapidly because of its high replication rate and the low fidelity of its reverse transcriptase. Viral populations found in newly infected hosts are highly homogenous, although continuous viral evolution generates multiple and distinct variants over time which remain highly related throughout the course of infection^{327, 330, 331, 342, 343}. Replacement of viral lineages and an increase in divergence and heterogeneity of viral quasispecies are observed over time²⁵⁰. Recent studies have attempted to identify ancestral strains within a host, responsible for productive clinical infection as this could be instrumental in elucidating the molecular basis of HIV-1 transmission and in designing effective vaccines⁹⁸.

Following primary infection, disease in some individuals progresses rapidly, while others, albeit rarely, remain healthy with low plasma viral loads, high CD4 counts, strong virus-specific CTL responses and/or high neutralizing antibody activity for many years. Some studies in infants have demonstrated a positive association between viral diversity in C2V5, CD4 cell decline and disease progression^{344, 345}, whereas others have showed that a higher level of diversity was associated with strong immune pressure and slower disease progression^{328, 332, 346-349}. The conflicting data could be explained, in part, by the various factors contributing to viral diversity such as the mode of transmission, the quality of the immune response, the use of anti-retroviral therapy, random mutations, recombination events or viral fitness³⁵⁰⁻³⁵⁴.

Following acute HIV infection, the effect of treatment on viral diversity is not well documented. Early antiretroviral treatment, by limiting viral replication, could attenuate viral diversity which could, in turn, protect from CTL escape and from chronic activation and exhaustion of the immune system. On the other hand, a low antigenic diversity could prevent the initiation of a broad immune response in a context of a more preserved immune system.

Env is the most variable HIV-1 gene and the C2V5 region is particularly variable in sequence and length³⁵⁵. This region is also highly glycosylated and sequence evolution in this region can affect sensitivity to neutralizing antibodies^{246, 356}. In the context of a very homogenous viral population such as HIV-1 primary infection, studying the *env* gene may be useful to highlight the effect of a therapeutic intervention on viral evolution. Therefore, we investigated the effect of antiviral therapy on sequence diversity in the *env* gene in 18 patients recently infected with HIV-1. We also evaluated changes in V3/V4/V5 lengths and potential N-linked glycosylation (PNG) sites.

Methods

Study population

Eighteen subjects were selected from a prospective cohort of individuals participating in the Primary HIV-1 infection Cohort in Montreal³⁵⁷ and were recruited from several clinical sites and were followed for one year. Patients were enrolled in the Cohort according to acute infection criteria which consist of a negative HIV enzyme

[Type text]

immunoassay serology (EIA) with positive p24 antigen or a positive EIA with indeterminate Western Blot and positive p24 antigen. In order to confirm acute infection, sera were tested with a detuned EIA (Abbott)³⁵⁸. Nine subjects did not received antiretroviral therapy during the study. Eight patients initiated treatment in the first month following HIV-1 infection diagnostic (range from 1 day to 25 days) and one patient initiated two months post diagnostic (57 days). One patient had started treatment one week prior to the first visit. Nine subjects deferred initiation of antiretroviral therapy during the study. The decision to initiate ART or not was made by physician and the patient, based on clinical judgment and patient preference. Plasma HIV-1 RNA quantification was obtained by assay from Chiron 3.0 which has a lower limit of detection of 50 copies per ml. HIV-1 primary infection was first assessed by clinical and epidemiological history. Viral sequences were obtained from proviral DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), from plasma RNA and from replication-competent viruses recovered from an ultrasensitive PBMC culture described elsewhere³⁵⁹.

PCR amplification of the *env* gene

Viral RNA was extracted from all positives wells and from plasma using QIAamp Viral Mini Spin Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), according to the manufacturer's instructions and reverse transcribed using SSIII/RT enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR was performed with primers E90 and E110 covering the C2V5 region. Amplification conditions were: 94°C for 5 minutes followed by 35 cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 68°C for 1minute and 30 sec, and a final extension at 68°C

during 10 minutes was performed. Proviral DNA was extracted from PBMC and DNA was serially diluted and amplified by PCR as described earlier without the RT step. All positive results from RNA isolation and the lowest positive PCR reaction from DNA sample were sequenced at Génome Québec sequencing facilities on an 3730xl DNA Analyzer systems from Applied Biosystems (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Quebec, Canada).

Phylogenetic analysis:

Sequences were aligned using Clustal W version 1.83 (Thompson, 1994) followed by manual alignment editing using BioEdit version 7.0.4.1. Pairwise alignment parameters were set to the dynamic "slow-accurate" programming, using 10 as the gap opening penalty and 0.1 as the gap extension penalty. Multiple alignment parameters included a gap extension penalty equal to 0.2. Pairwise nucleotide distance within each patient were estimated with Kimura two-parameter model using a 2.0 transition/transversion ratio as implemented in the Mega 3.1 software with a 1000 bootstrap value.

Statistical analysis

We used the non-parametric Mann-Whitney method to compare the virus sequence evolution within all patients at baseline at year 1 and at each time point within untreated and treated groups. We then compared the diversity for each group at each time point with the Wilcoxon test. Pearson's khi-two and/or correlation coefficient test were used to

[Type text]

test the relation between variables. All analysis were done using SPSS version 15 with a lower significant limit of 5%.

Results

Patient characteristics

Eighteen patients from the Montreal Primary HIV-1 Infection Cohort were selected and followed for one year; 8 patients initiated treatment within one month of enrolment, one patient started treatment after 2 month and 9 did not initiate treatment during the study period. As illustrated in Table 1, there were no significant differences between the two groups according to mode of acquisition, gender, median CD4 cell count (400 vs 650 cells/mm³ in the treated vs untreated group p=0.09) and median viral load (81,283 copies/ml versus 46,773 copies/ml respectively p=0.436) at baseline.

CD4 cell recovery

At one year of follow-up, the CD4 cell counts increased in the treated group (from a median CD4 of 400 to 580 cells/mm³ p=0.021) while it decreased or remained stable in the untreated group (median CD4 of 650 cells/mm³ to 520 cells/mm³ p=0.141). The difference between the groups was significant, -130 for the untreated group compared to +180 cells/mm³ for the treated patients (p=0.004).

Viral Quantification

Using an ultrasensitive culture technique, virus was recovered from all patients at baseline and at follow up visit one year later. We observed a decline in IUPM in 8/9 treated patients and in 3/9 untreated patients ($p=0.016$). At the start of the study, there was no significant difference in the number of infectious units for both groups median IUPM ($p= 0.436$). We observed a significant difference in the variation of IUPM between the two groups, with a decline in the treated group of -5.42 IUPM and an increase of $+0.87$ IUPM in the untreated group ($p=0.001$). IUPM decline was not correlated with viral load at baseline ($p=0.830$).

Sequence diversity

All HIV isolates were subtype B. Highly specific clustering of autologous sequences from patients excluded possible cross-contamination among subjects or with laboratory strains, although three transmission pairs were identified by clinicians and confirmed by close similarities of C2V5 sequences and bootstrap values ($\geq 98\%$) (Data not shown)³⁶⁰.

Evolution of HIV-1 envelope C2V5 is limited in the year following acute infection

We measured intra-patient sequence diversity for all patients at the time closest to infection, and before treatment initiation except for one patient that initiated treatment 5 days before enrolment in the study. The median diversity at baseline was 0.19% and was

[Type text]

not statistically different between patients who initiated treatment compared to the patients who remained untreated (0.09% versus 0.23% $p=0.93$, Table 2). There was no correlation between viral diversity and CD4 count ($p=0.64$), viral load ($p=0.704$) or IUPM ($p=0.830$).

During the first year of infection, sequence diversity increased +0.06% in the treated group ($p = 0.678$) and +0.15% for the untreated group ($p=0.028$). The difference between the two groups was not statistically significant ($p=0.297$).

Characterization of V3

Clonal analysis of the V3 loop revealed that all subjects harboured viruses with a single V3 loop length, most of them (15 patients) consisting of 35 amino acids, while 3 patients had 34 amino acid V3 loops, missing the aa 23T. Two of these three subjects were in a transmission pair. Viral populations were extremely homogenous in V3 at baseline for both groups and increased in both group during our study to reach 0.20 for the treated patients and 0.76 for the untreated group. We observed an increase in sequence diversity in V3 for both the treated group (+0.20% $p= 0.674$), and the untreated group (+ 0.75% $p= 0.327$); however the difference between the two groups was not significant. $p=0.67$).

Characterization of V4

Sequence patterns for V4 were more complex than for V3. The lengths of V4 loops ranged from 28 to 38 amino acids, and 4 subjects had viral populations harbouring 2 different loop lengths while one subject had 3. Viral diversity for the entire population was 0.08% at baseline and was not significantly different between the two groups ($p=0.436$). It increased to 0.49% after one year. However, in the group initiating treatment, diversity was 0.35% at baseline and decreased during the course of infection to reach 0.26% one year later ($p = 0.735$). In the untreated group, diversity increased from 0.0 to 0.73% ($p=0.046$). Although there was a greater increase in viral evolution for the untreated group, the differences in rate of sequence evolution did not reach statistical significance between the two groups (-0.09% for the treated group and $+0.73\%$ for the untreated group, $p=0.094$).

Characterization of V5

All patients except one had clones with a unique V5 length. V5 lengths ranged between 11 to 16 amino acids. Baseline diversity was extremely low for the entire population ($p=0.73$). It increased for both group and was 0.45 for the treated patients, and 0.77 for the untreated group after one year ($p=1$). For the entire population, viral diversity in V5 did not significantly increase during the first year of infection ($+0.56\%$ $p=0.340$). In the treated group, diversity increased from 0.0% to 0.45% ($p=1.0$) while viral diversity significantly increased from 0.00% to 0.77% in the untreated group ($p=0.046$). The

[Type text]

difference was not statistically different between the two groups. (+0.45 for the treated group and +0.77 for the untreated patients $p=0.34$)

Potential N-glycosylation sites

We looked at changes in the PNG sites during the first year of infection. There was an increase in the number of sites in most subjects. There was no change in the number of glycosylation sites in the treated group with a median of 11.0 at visit one and of 12.0 a year later ($p=0.66$). In the untreated group, the average sylation site increased non-significantly from 11.4 to 11.90 ($p=0.51$).

Discussion

HIV-1 diversification has been associated with an attempt of the virus to escape control by the immune system. However, other studies have linked high level of sequence diversity with slower disease progression and better immune responses^{328, 346-349}.

In this study we evaluated the effects of early antiretroviral therapy initiated during acute HIV-1 infection on viral suppression and evolution, exploring the hypothesis that suppression of viral replication will limit viral diversification and its potential to escape the immune system. Our results suggest that early treatment does play a role in viral reservoir decay and may limit or slow viral diversification.

As expected, antiretroviral therapy led to a rapid decline in viral load and recovery in CD4 cell counts. Using an ultrasensitive culture method, we were able to recover replication-competent virus in all subjects at baseline and in 7/9 treated patient with undetectable viral load at one year. The level of PBMC IUPM was significantly lower in the treated group. We did not observe a decline in IUPM in untreated patients.

After one year of suppressive therapy, replication-competent viruses isolated from PBMC represent predominantly virus from latent reservoirs. Most studies showing the stability of viral reservoirs over time have been performed in chronically infected individuals. Our subjects started antiretroviral therapy 4 weeks after infection except for one patient that started treatment 8 weeks after infection. Therefore, early treatment may have helped limit the replenishment of these reservoirs.

[Type text]

In order to study viral evolution, we chose to study the *env* gene. HIV-1 *env* gene encodes the surface glycoproteins gp120 and gp41 and exhibits a higher degree of evolution of HIV-1 genes (approximately 1% per year), particularly in the hypervariable regions of gp120 C2V5^{250, 330, 331}. These domains are highly N- and O-glycosylated, and glycosylation changes have been associated with escape from neutralizing antibodies²⁵⁵. Also, mutations in *env* have been shown to affect T lymphocyte cytotoxic epitopes^{252, 361}.

We examined the viral diversity of the C2V5 region and of V3, V4 and V5 individually during the first year post infection in treated and untreated subjects. Viral diversity was low overall²⁵⁰. At the end of study, there was a trend towards higher diversity in the untreated group for C2V5 (+0.09%), V3 (+0.56%), V4 (+0.82%) and V5 (+0.32%) compared to the treated group, although this was not statistically significant. C2V5 diversity did not correlate with viral load, which was consistent with a previous study³⁵⁰, although another study has shown a correlation with subtype CRF02_AG infection³⁶². There was no link between CD4 count and viral diversity, either at baseline or one year post infection, in contrast to a study by Delwart et al. that showed reduced diversity in patients with rapid CD4 decline³²⁸.

Our results suggest that treatment may play a role in limiting C2V5 sequence diversity by either diminishing the level of viral replication, thus decreasing the virus's reverse transcriptase opportunity to generate new variants, and/or by diminishing viral antigen

exposure to the immune system, limiting pressure on the virus to generate better adapted quasispecies.

Several studies have shown that hypervariable loops V3, V4 and V5 accumulate mutations at glycosylation sites and that the number of PNG sites may vary during the course of infection. This was not the case for most of our patients during the first year of infection. V3 lengths were relatively stable during the first year and we did not observe any marked increase of the net charge of the V3 loop³⁶³⁻³⁶⁵. However, viral diversity in V3 did increase during the first year. The observed sequence variability was similar for both groups. V4 and V5 loop diversity increased significantly in the untreated group, while V4 tended to decrease and V5 showed a slight increase in the treated group.

The accumulation of glycosylation sites are known to affect profoundly the susceptibility to neutralizing antibodies. Many studies have showed the increase of glycosylation sites with time after infection^{255, 356, 366}. Although we observe an increase in PNG sites for both groups, our results did not reach statistical significance. Nevertheless, different patterns of PNG were observed and could affect neutralization sensitivity.

Characterizing viral diversity during early infection is important in order to identify strains that are more likely to establish infection. Conserved epitopes within these ancestral strains could be targeted by vaccines in order to elicit strong cellular or humoral immune responses against viruses with the highest potential to initiate infection. Our study has shown that viral diversity is low during the first year of infection in treated and

[Type text]

untreated patients, confirming that very few viral variants are transmitted to a new host, and infection will be established from these initial variants. Furthermore, we did observe a trend toward lower sequence diversity in C2V5, V3, V4 and V5 loop in the treated patient group suggesting that early treatment may be limit viral evolution. Low viral diversity could be more amenable to viral control with immunotherapeutic strategies. In our study, early treatment during acute infection was associated with a decrease in the size of viral reservoirs and a trend towards lower diversification. These results support further studies of early treatment during acute infection to evaluate whether clinical benefits can be derived from such a strategy.

Acknowledgements

We wish to thank all the patients, our Network of Clinical Investigators and their research team: R.G. Lalonde, J. Allan, N. Gilmore, M. Klein, J. MacLeod, M. Potter, C Tsoukas, J. Falutz, J Cox, from the McGill University Health Center (MUHC), M.A. Charron, C. Fortin, A. de Pokomandy, A. Talbot, J. Bruneau for Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), F. Asselin, M. Boissonneault, L. Charest, H. Dion, Emmanuelle Huchet, S. Lavoie, D. Legault, D. Longpré, P.J. Maziade, M.E. Morin, D. Murphy, V.K. Nguyen, R. O'Brien, V.D. Pham, S. Vézina for Clinique médicale l'Actuel, M.A. Charron, S. Dufresne, P. Junod, M.S. Joyal, B. Lessard, F. Laplante, Y. Parent, D. Poirier, M. Potter, A. Talbot, D. Tessier, È. Sasseville for Clinique médicale du Quartier Latin and Roger LeBlanc for Clinique médicale Goldberg, Leblanc, Rosengren, MacLeod, Gilmore. We also want to thank Genevieve Bélanger-Jasmin for her administrative assistance, Miguel Chagnon for help with statistical analysis and Dr. Johnson Wong for providing the CD3,8 antibody. CT and JPR are clinician scientists supported by the Réseau du Fond de la Recherche en Santé du Québec. This work was supported by CIHR grant HSH6388, HOP64507 and the FRSQ. As well as FRSQ-SIDAMI Network.

Table 1. Characteristics of subjects

	Treated (n =9)	Untreated (n=9)
Gender		
Male	7 (78%)	8 (89%)
Female	2 (22%)	1 (11%)
Mode of transmission		
MSM	7 (78%)	6 (67%)
Hetero	1 (11%)	2 (22%)
IVDU	0 (0%)	1 (11%)
Work related	1 (11%)	0 (0%)
Race/Ethnicity		
White non-Hispanic	6 (67%)	9 (100%)
African American	1 (11)	0 (0%)
Hispanic	2 (22%)	0 (0%)
Age	36.00 ± 8.03	43.11±7.77
Symptoms at onset		
Yes	7 (78%)	7 (78%)
Non	1 (22%)	2 (22%)
Time post infection		
Between 3 and 6 months	5 (56%)	8 (89%)
More than 6 months	4 (44%)	1 (11%)
CD4 count at baseline	400* (90-860)	650* (470-942)
VL at baseline	81283 (3981- >1 000 000)	46773 (575- >1 000 000)

MSM: Men having sex with men
 IDVU: Intravenous drug user
 *: Median value

Table 2. Median value for treated and untreated patients and of entire population for C2V5, V3, V4 and V5

Env domain	Diversity					
		Treated (% diversity)	Intra-group p-value*	Untreated (% diversity)	Intra-group p-value	Intergroup p-value**
C2V5	Baseline	0.09		0.23		p=0.93
	One year	0.15		0.38		p=0.44
	Variation	0.06	p=0.68	0.15	p=0.028	p=0.297
V3	Baseline	0.00		0.00		p=0.49
	One year	0.20		0.76		p=0.34
	Variation	0.20	p=0.67	0.76	p=0.33	p=0.67
V4	Baseline	0.35		0.00		p=0.436
	One year	0.26		0.73		p=0.67
	Variation	-0.09	p=0.735	0.73	p=0.046	p=0.094
V5	Baseline	0.00		0.00		p=0.73
	One year	0.45		0.77		p=1.0
	Variation	0.45	p=1.0	0.77	p=0.046	p=0.34

*Non parametric Wilcoxon test

**Non parametric Mann-Whitney test

[Type text]

Figure 1

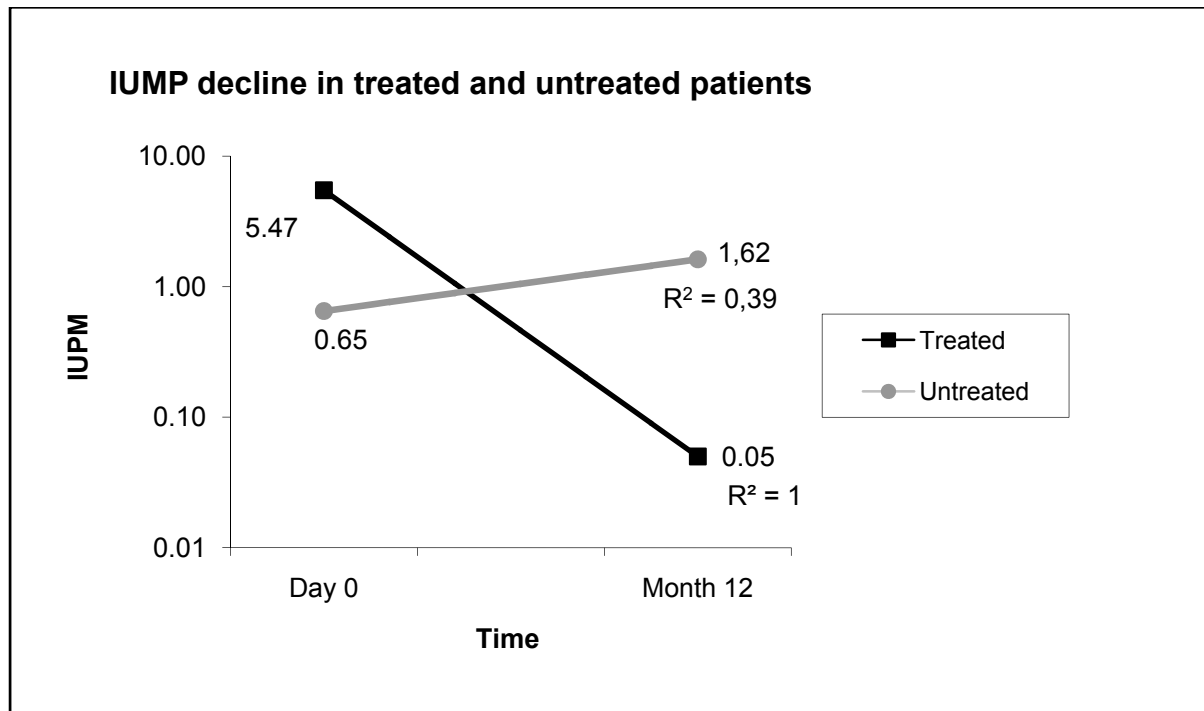


Figure 1 : Decline in infectious units per millions of PBMC (IUPM) in treated and untreated patient during the first year post infection.

Figure 2

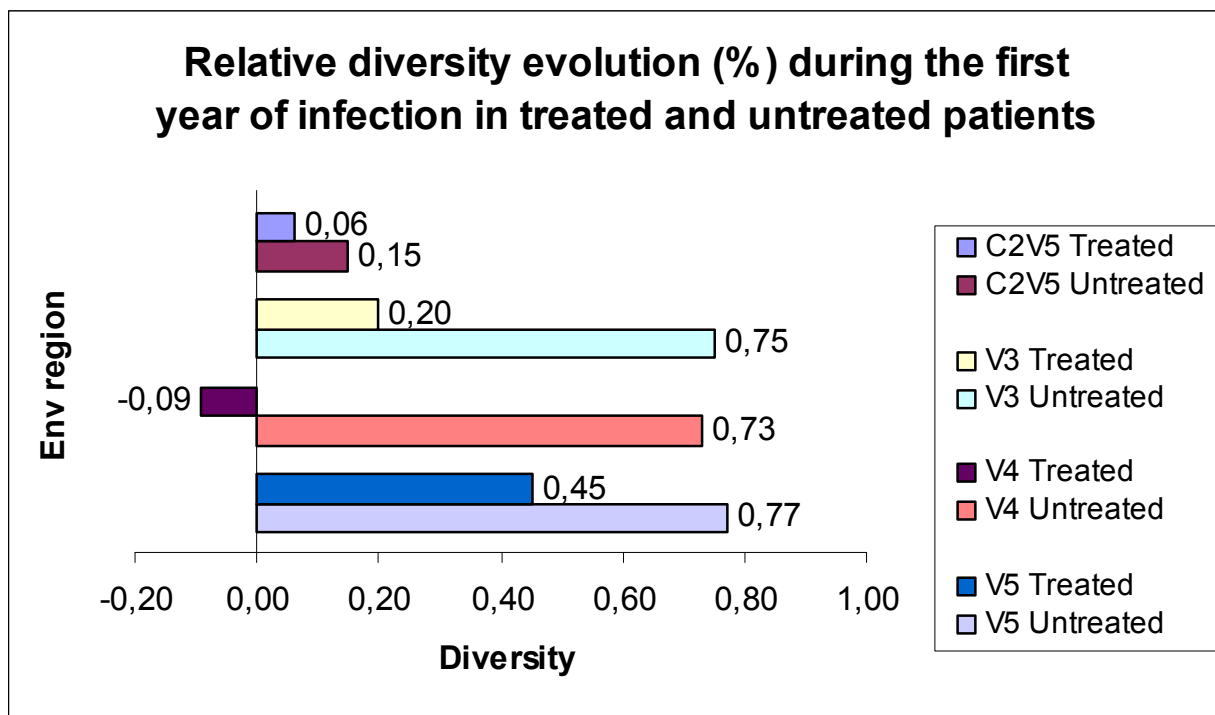


Figure 2: Average sequence diversity evolution (%) for all patients for hypervariable loops V3, V4, V5 and C2V5 at time closet to infection (V1) and after one year follow-up (V10)

References

1. Diaz RS, Sabino EC, Mayer A, deOliveira CF, Mosley JW, Busch MP. Lack of dual HIV infection in a transfusion recipient exposed to two seropositive blood components. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12:1291-5.
2. Zhang LQ, MacKenzie P, Cleland A, Holmes EC, Brown AJ, Simmonds P. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J Virol* 1993;67:3345-56.
3. Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993;261:1179-81.
4. McNearney T, Hornickova Z, Markham R, Birdwell A, Arens M, Saah A, Ratner L. Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10247-51.
5. Goodenow M, Huet T, Saurin W, Kwok S, Sninsky J, Wain-Hobson S. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1989;2:344-52.
6. Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JI. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999;73:10489-502.
7. 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. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7552-7.
8. Strunnikova N, Ray SC, Lancioni C, Nguyen M, Viscidi RP. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 in relation to disease progression in children. *J Hum Virol* 1998;1:224-39.
 9. Strunnikova N, Ray SC, Livingston RA, Rubalcaba E, Viscidi RP. Convergent evolution within the V3 loop domain of human immunodeficiency virus type 1 in association with disease progression. *J Virol* 1995;69:7548-58.
 10. Bagnarelli P, Mazzola F, Menzo S, Montroni M, Butini L, Clementi M. Host-specific modulation of the selective constraints driving human immunodeficiency virus type 1 env gene evolution. *J Virol* 1999;73:3764-77.
 11. Delwart EL, Pan H, Sheppard HW, Wolpert D, Neumann AU, Korber B, Mullins JI. Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J Virol* 1997;71:7498-508.
 12. Ganeshan S, Dickover RE, Korber BT, Bryson YJ, Wolinsky SM. Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. *J Virol* 1997;71:663-77.
 13. Greenier JL, Van Rompay KK, Montefiori D, Earl P, Moss B, Marthas ML. Simian immunodeficiency virus (SIV) envelope quasispecies transmission and evolution in infant rhesus macaques after oral challenge with uncloned SIVmac251: increased diversity is associated with neutralizing antibodies and improved survival in previously immunized animals. *Virol J* 2005;2:11.

14. Masciotra S, Owen SM, Rudolph D, Yang C, Wang B, Saksena N, Spira T, Dhawan S, Lal RB. Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage replication, and coreceptor adaptation during HIV-1 disease progression. *Aids* 2002;16:1887-98.
15. Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ, Whetsell AJ, Furtado MR, Cao Y, Ho DD, Safrin JT. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 1996;272:537-42.
16. Bello G, Casado C, Garcia S, Rodriguez C, del Romero J, Borderia AV, Lopez-Galindez C. Plasma RNA viral load is not associated with inpatient quasispecies heterogeneity in HIV-1 infection. *Arch Virol* 2004;149:1761-71.
17. Bernardin F, Herring BL, Peddada L, Delwart EL. Primary infection of a male plasma donor with divergent HIV variants from the same source followed by rapid fluctuations in their relative frequency and viral recombination. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:1009-15.
18. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995;267:483-9.
19. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373:117-22.
20. Delwart E, Magierowska M, Royz M, Foley B, Peddada L, Smith R, Heldebrandt C, Conrad A, Busch M. Homogeneous quasispecies in 16 out of 17 individuals during very early HIV-1 primary infection. *AIDS* 2002;16:189-95.
21. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC, et al. Identification and characterization of conserved and

- variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986;45:637-48.
22. Derdeyn CA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Mokili JL, Muldoon M, Denham SA, Heil ML, Kasolo F, Musonda R, Hahn BH, Shaw GM, Korber BT, Allen S, Hunter E. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* 2004;303:2019-22.
 23. 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;80:9586-98.
 24. Routy JP, Machouf N, Edwardes MD, Brenner BG, Thomas R, Trottier B, Rouleau D, Tremblay CL, Cote P, Baril JG, Remis RS, Sekaly RP, Wainberg MA. Factors associated with a decrease in the prevalence of drug resistance in newly HIV-1 infected individuals in Montreal. *AIDS* 2004;18:2305-12.
 25. Ndongala ML, Peretz Y, Boulet S, Doroudchi M, Yassine-Diab B, Boulassel MR, Rouleau D, Tremblay C, Leblanc R, Routy JP, Sekaly RP, Bernard NF. HIV Gag p24 specific responses secreting IFN-gamma and/or IL-2 in treatment-naive individuals in acute infection early disease (AIED) are associated with low viral load. *Clin Immunol* 2009.
 26. Tremblay CL, Giguel F, Merrill DP, Wong JT, Rosenberg E, Kalams S, Walker BD, D'Aquila RT, Hirsch MS. Marked differences in quantity of infectious human immunodeficiency virus type 1 detected in persons with controlled plasma viremia by a simple enhanced culture method. *J Clin Microbiol* 2000;38:4246-8.

27. Brenner BG, Roger M, Moisi DD, Oliveira M, Hardy I, Turgel R, Charest H, Routy JP, Wainberg MA. Transmission networks of drug resistance acquired in primary/early stage HIV infection. *AIDS* 2008;22:2509-15.
28. 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. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003;422:307-12.
29. Draenert R, Allen TM, Liu Y, Wrin T, Chappey C, Verrill CL, Sirera G, Eldridge RL, Lahaie MP, Ruiz L, Clotet B, Petropoulos CJ, Walker BD, Martinez-Picado J. Constraints on HIV-1 evolution and immunodominance revealed in monozygotic adult twins infected with the same virus. *J Exp Med* 2006;203:529-39.
30. Jones NA, Wei X, Flower DR, Wong M, Michor F, Saag MS, Hahn BH, Nowak MA, Shaw GM, Borrow P. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 2004;200:1243-56.
31. Mani I, Gilbert P, Sankale JL, Eisen G, Mboup S, Kanki PJ. Inpatient diversity and its correlation with viral setpoint in human immunodeficiency virus type 1 CRF02_AG-IbNG infection. *J Virol* 2002;76:10745-55.
32. Jensen MA, Coetzer M, van 't Wout AB, Morris L, Mullins JI. A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol* 2006;80:4698-704.
33. Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI. 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;77:13376-88.

34. Brumme ZL, Dong WW, Yip B, Wynhoven B, Hoffman NG, Swanstrom R, Jensen MA, Mullins JI, Hogg RS, Montaner JS, Harrigan PR. Clinical and immunological impact of HIV envelope V3 sequence variation after starting initial triple antiretroviral therapy. *Aids* 2004;18:F1-9.
35. Cheng-Mayer C, Brown A, Harouse J, Luciw PA, Mayer AJ. Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIVSF33A variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. *J Virol* 1999;73:5294-300.

2.2 Étude de la résistance chez les sous-types non-B

Nous avons effectué deux études en Afrique de l'Ouest. D'abord, nous avons évalué la résistance primaire au sein d'une cohorte de 101 sujets VIH+ non traités au Mali. Par la suite, nous avons évalué l'efficacité des traitements antirétroviraux chez 801 sujets HIV+ du Mali et du Burkina Faso. Suite à l'initiation du traitement, nous avons évalué la prévalence de mutations de résistance chez les patients en échec thérapeutique et comparé les voies moléculaires de la résistance. Notre étude nous a également permis d'obtenir un portrait de la diversité virale ainsi que leur lien phylogénétique.

L'article: High level of primary resistance in a cohort of treatment naive individual in Mali a été soumis à: HIV Medecine Juin 2009

Annie Chamberland, en collaboration avec Alpha Haidara, a effectué les extractions d'ARN et l'amplification par PCR ainsi que la réaction de séquençage puis elle a procédé à l'édition et l'alignement des séquences et à l'analyse des mutations de résistance et aux analyses phylogénétiques. Elle a également participé à la rédaction de l'article ainsi qu'aux révisions du manuscrit.

Le second article intitulé : Characterization of drug resistance in antiretroviral treated patients infected with HIV-1 CRF02_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso a été publié dans la revue Antiviral therapy, 2008;13:141–148. L'étudiante a participé à part égale avec Mohamed Sylla à toutes les expériences de biologie moléculaire, à l'analyse des séquences puis à la détermination des mutations de résistance ainsi qu'à la construction des arbres phylogénétiques. De plus, elle a participé à la rédaction du manuscrit ainsi que pris part aux révisions.

High level of Primary Resistance in a cohort of treatment-naïve individuals in Mali

Alpha Haidara¹, PharmD, Annie Chamberland^{1,2}, PhD, Mohamed Sylla,² MSc, Souleymane Ag Aboubacrine³, Dr, Mamadou Cissé⁴, Dr, Hamar A. Traore³, Pr, Moussa Y. Maiga⁵, Pr, Anatole Tounkara³, Pr, Vinh Kim Nguyen¹, PhD and Cécile Tremblay^{1,2}, M.D, FRCPC.

For the ATARAO Group1 : Appuyer le Traitement Anti Rétroviraux en Afrique de l'Ouest

¹Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada,

²Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada,

³Hôpital national du Point-G, Bamako, Mali, ⁴CÉSAC, Bamako, Mali, ⁵Hôpital Gabriel Touré,

Bamako, Mali

Corresponding author: Cécile Tremblay, M.D., FRCPC

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 3840 rue St-Urbain, Bureau 7-355, Montréal (Qc)

H2W 1T8, Canada, Telephone: 514-890-8000, Ext 14613, Fax: 514-412-7234.

Support: This work was supported by CIHR Op # 152243 and by Virco BVBA. CT and VKN are Clinician Scientists supported by the Réseau du Fonds de la Recherche en Santé du Québec

(FRSQ) and Réseau FRSQ-SIDA

“RUNNING HEAD: Primary Drug Resistance in HIV-1”

Background: As access to antiretroviral drugs increases in developing countries, it will be important to monitor the emergence of resistance and define the molecular pathways involved to identify optimal therapeutic regimens.

Methods: We performed genotypic resistance testing on plasma obtained from 101 HIV-infected treatment-naïve individuals from Mali. Genotyping was carried out using the Virco protocols and mutations identified using the HXB2 reference sequence.

Results: CRF02_AG was the most common subtype representing 71.29% of the total isolates. Other subtypes were: B, C, G, CRF06_CPX, CRF09_CPX, CRF01_AE, A2/CRF16_A2D, A1 and CRF13_CPX. 28.70% of isolates harbored resistance mutations. The most frequent NRTI-resistance mutations were T215Y/A, NNRTI were K103N/T and PI, L10I/V. The minor PI resistance mutation L10I/V was present in 18.81% of subjects and may represent a polymorphism. Phylogenetic analysis revealed that these isolates were not genetically linked. Even excluding the L10I/V mutation, the rate of primary resistance was still 9.90%.

Conclusion: Resistance mutations were seen in 28.70% of subjects, which is higher than what has been previously described in Mali. Even excluding L10I/V mutations, primary resistance was still 9.90%. Our study reflects the need to monitor the evolution of resistance on a regular basis and follow the trends of transmitted resistance.

Keywords: HIV subtypes, Mutations, Primary resistance

Introduction

The initiation of highly active antiretroviral therapy (HAART) in developing countries where HIV-1 non-B subtypes circulate has been associated with good clinical outcomes when combined with appropriate clinical follow-up¹. However, as HAART is scaled up, it is essential to monitor the emergence of primary resistance, as this may impact success of an already limited choice in first-line therapies in resource-limited settings². Furthermore, studies have shown that polymorphisms in non-B subtype genomes can lead to different pathways to drug resistance than those studied in subtype B HIV-1^{3,4,5}. We have studied the rate of primary resistance in Mali, a resource-limited country in West Africa. With a population of 11 million inhabitants, Mali has an HIV prevalence rate estimated at 1.3% representing 146,000 persons infected with HIV⁶. The first antiretroviral drugs have been available in 1997, followed by roll-out of HAART through a National Treatment Program in 2004 with stavudine, lamivudine and nevirapine recommended as first line treatment⁷. A study in 2006 estimated that the overall prevalence of primary resistance in Mali was 11.5%⁷. In the context of the scale-up of HAART, we therefore decided to evaluate the evolution of primary resistance in this country.

Methods

Study Population

101 antiretroviral naïve HIV-infected individuals from Mali were prospectively enrolled in this study. Individuals were recruited from three different sites in Bamako: Centre d'Écoute de Soins, d'Animation et de Conseil (CESAC), the Hôpital du Point G (HPG) and the Hôpital Gabriel Toure (HGT). Plasma samples were collected before the initiation of HAART. Samples were stored at -80 degrees until sent on dry ice for genotyping at the retrovirology laboratory at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada. This study was approved by the ethics committees of Mali and CHUM research centre.

Viral extraction, PCR and sequencing

Viral RNA was extracted using viral QIAamp spin Mini Kit QIAGEN and according to the protocol provided by Virco. It was then amplified using super script III HIFI with primers (5'out and 3'RT provided by Virco) covering the protease reverse-transcriptase (RT-PR) genes. For the nested PCR, we used the HF expand as PCR enzyme and primers (5'IN and 3'IN provided by Virco). Amplification conditions were as follows: first amplification (one step RT-HIFI): pre - PCR 53°C/30min for reverse transcription and 94°C/2min for denaturing followed by 40 cycles (92°C/15sec, 55°C/30sec, 68°C/2min30sec) and then a final extension of 7min to 68°C. For the nested PCR, the conditions were: pre-PCR

[Type text]

94°C/2min for denaturing followed by 30 cycles (94°C/15sec, 60°C/30sec and 72°C/2min) and then a final extension of 7min to 72°C. It should be noted that, from the 11st cycle, the time elongation increased by 5 seconds for each cycle. All samples underwent two PCR followed by a purification step of the nested product. The presence of amplicons was then confirmed by separation on 1% agarose gel. The purification was done using QIAprep spin Miniprep Kit 50 of QIAGEN. Sequencing was performed at Genome Quebec (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Quebec, Canada) using eight primers (provided by Virco) covering the PR-RT genes.

Analysis of data

The sequences were analyzed using Sequencer 4.5 Gene code software corporations, Ann Arbor, MI. Analyses of drug resistance mutations and subtypes were done using the Virco algorithm (Virconet). Sequences were also analyzed using the Stanford university HIV drug resistance database

(http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivdb&action=showSequenceForm).

Phylogenetic analysis

The sequences were aligned with references representing all subtypes and FIU using CLUSTAL W version 1.83 (Thompson, 1994), followed by manual alignment using BioEdit edition version 7.0.4.1. Sub-types references were selected from the Los Alamos

National Library database for HIV-1 (<http://www.hiv.lanl.gov/>). The phylogenetic tree was constructed with MEGA software version 4.1, using the Kimura two parameter model (neighbor joining method) and bootstrap value of 500 replicates. The sequences that were included were the consensus sequence for the M group and study sequences ($n=101$).

Statistical study

Statistical analyses were performed using the software Statistical Analysis System (SAS) version 9.1.

Results

Study Population

Among the 101 subjects included in this study, 42 were enrolled at CESAC, at HPG and 16 patients at HGT. Clinical data was lacking for one subject. Among the remaining 100 subjects, 76 were women and 24 men. The mean age was 35.41 years and the median CD4 cell count was 135 cells/mm³ (1-585 cells/mm³) (Table1).

All our samples could be amplified and sequenced. CRF02_AG subtype was identified in 72 of the 101 samples (71.29%). The distribution of other subtypes was as follows: 8 CRF06_cpx (7.92%), 6 B (5.94%), 4 C (3.96%), 3 G (2.97%), 2 CRF09_cpx (1.98%), 2 CRF01_AE (1.98%), 2 A1 (1.98%), 1 CRF13_cpx (0.99%) and 1 A2/CRF16-A2D (0.99%) (Fig. 1).

Resistance Mutations

Table 2 summarizes all drug-resistance mutations observed in this study. Out of 101 patients, 29 (28.70%) harbored drug resistance mutations. Among these patients, 5 had NRTI mutations (4.95%), 6 NNRTI mutations (5.94%) and 20 PI mutations (19.80%). Two patients had resistance mutations to more than one drug class. The T215A/Y was the most frequently observed NRTI mutation followed by M41L, D67N, M184V, L210W, and K219E (Fig. 2A). K103N was the most frequent NNRTI mutation followed by V179E, V108I and Y181C (Fig. 2B). L10I/V was the most frequent PI mutation, observed in

18.81% of patients (Fig. 2C). Phylogenetic analysis showed no epidemiological link between subjects with these mutations (data not shown). Excluding the L10I/V mutation which role is not clear in non-B subtypes, the prevalence of primary resistance was still 9.90%.

Several other minor mutations or polymorphisms were observed at high frequencies such as K20I (found in 90% of patients), M36I (94%), H69K (93%) and 93% for L89M.

Dicussion

We evaluated primary antiretroviral drug resistance in Bamako, Mali from samples collected between July 2007 and October 2008. Subtype analysis showed a high frequency of the recombinant form CRF02_AG at a rate of 71.29% (Fig. 1). Our results are consistent with a recent study conducted in Mali, which showed a rate of 72%⁷. In 2005, the frequency of this recombinant form was 75% in 2005 and 88% in 2002⁸. There seems to be a decline in the frequency of CRF02_AG over time. This could be due to the emergence of new recombinants forms such as CRF13_cpx and A2/CRF16-A2D which had not been described in Mali prior to this study. These new recombinant forms may reflect the diversification of the HIV-1 epidemic in this country, due to both migration from neighboring countries and recombination events within the local population. This increasing diversity could lead to the emergence of new resistance pathways that could affect first-line therapy in the future.

Several studies have suggested that non-B isolates show a different pattern of resistance mutations than subtype B^{9, 10}. Reports have shown that the mutation V106M confers resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in subtype C HIV¹¹, and is preferentially selected in vivo¹² and that the D30N mutation is not preferentially selected by HIV-1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir¹³. We have previously shown that subtype K reverse transcriptase may preferentially select for the thymidine analog mutations 2 (TAM-2) pathways in the presence of nucleoside reverse transcriptase inhibitors¹⁴. Differences in how resistance evolves between different subtypes

may mean that some second-line regimens will be less effective than previously thought. Moreover, treatment of patients with primary resistance will be compromised from the outset, potentially leading to onward transmission of drug resistant HIV. Use of compromised treatment regimens may not result in the expected prevention benefits; that is, decreased HIV transmission.

WHO currently recommends first-line therapy with two NRTIs and one NNRTI, a combination with good efficacy, tolerability and simplicity, low cost, and good adherence to treatment¹⁵. The first-line regimens in Mali are based on this recommendation. ARVs have been made available in Mali since 1997, and are free since 2004. The recommended first-line regimen is a fixed-dose combination stavudine / lamivudine / nevirapine, currently prescribed free of charge for the majority of patients. The alternative first-line regimens are zidovudine / lamivudine / efavirenz or zidovudine / lamivudine / nevirapine. The recommended second-line regimen is abacavir /didanosine /indinavir, and the alternative drugs are tenofovir and lopinavir⁷ or the use of indinavir/ritonavir.

The availability of ARVs has brought great hope for HIV- infected individuals in resource-limited countries. The emergence and transmission of resistant virus could compromise the effectiveness of specific treatments in areas where the therapeutic options are limited¹⁶. There were limited data on primary ARV drug resistance before 2000 in these countries¹⁷. Preliminary data suggest that resistance may be emerging in countries currently scaling up access to antiretroviral therapy¹⁸. Africa is no exception to the rule. Reports from Uganda, Rwanda, Mozambique and Zambia have indicated a low prevalence of primary drug-

resistance mutations among treatment-naïve individuals¹⁹. A recent study shows a rate of primary resistance of 0% in Nigeria²⁰. The prevalence of primary resistance is estimated at 4.2% in one province of South Africa in 2002-2004²¹ and 4.3% in Congo²². Recently, a study in Tanzania showed that primary resistance to NRTIs and NNRTIs was detected among 3% and 4% of treatment-naïve patients, respectively¹⁹. In West Africa, primary resistance prevalence is estimated at 5.6% in Cote d'Ivoire²³, and 8.3% in Burkina Faso²⁴. These data support WHO's recommendation for surveillance of ARV resistance in developing countries like Mali.

In our study, we found a 28.70% prevalence of resistance mutations. This rate is very high compared to previous studies conducted in Mali, which reported 3% in 2005 and 11.5% in 2006⁷ including L10I/V mutations. Even if we exclude L10I/V, the prevalence of primary resistance would still be 9.90%. Moreover, another study conducted in Mali showed that the primary resistance was 0% in 2002⁸. This progression could reflect growing use of ARVs in this country as well as in neighbouring countries that have strong migratory ties to Mali. In developed countries, the prevalence of primary resistance at seroconversion range between 10 and 20%²⁵.

NRTI resistance associated mutations (M41L, D67N, M184V, L210W, T215A/Y and K219E) were present in four patients. They were mostly thymidine-associated mutations (TAM) except for one patient who harbored the M184V which confers resistance to lamivudine. One patient harboured three NRTI resistance mutations (M41L, M184V and T215Y) and two NNRTI mutations (K103N and V179E). This is the first reported case of

multi-drug resistant viral transmission in Mali. The mutations NNRTI (K103N, V108I, V179E and Y181C) were observed in six patients. Three of them had a K103N mutation and the other two had mutations V108I, V179E and Y181C. These mutations confer cross-resistance to most NNRTI. The patterns of mutations observed in our study are compatible with widespread use of triomune which contains nevirapine, stavudine and lamivudine, and the use of efavirenz and zidovudine as first line therapy in Mali.

In contrast, the use of protease inhibitors is very limited in Mali, and this is reflected in our data. Two PI-resistance mutations were identified: L33F was observed in one patient and L10I/V was observed in 19 subjects. It is unclear whether L33F and L10I/V represents resistance mutations or simply polymorphisms. L10I/V is associated with low-level resistance to most PIs except darunavir. Several studies have associated this mutation to the loss of virologic response to nelfinavir²⁶, saquinavir²⁷, fosamprenavir²⁸, lopinavir²⁹, indinavir³⁰, atazanavir³¹ and ipranavir³². Moreover, the L10I/V mutation was observed at higher frequency (18.81%) than in Burkina Faso (11.72%)³³, which forms the border with Mali. In order to assess whether there could be a founder effect, we performed a phylogenetic analysis which revealed no link between patients harbouring drug-resistance mutations (Fig. 3). The L33F mutation has also been recently reported by Derache and al.⁷ in Mali. This mutation is associated with low-level resistance to most PIs including lopinavir³⁴, nelfinavir³⁵ to atazanavir^{35, 36} and darunavir³⁷. Since PIs are not widely used in Mali these mutations are more likely to be polymorphisms.

We found several of RT and PR polymorphisms (Table 2). These polymorphisms, although not associated with a significant decrease in susceptibility to ARVs, may nonetheless contribute to an increase in resistance in the presence of accumulating major mutations under selective pressure by suboptimal treatments³⁸.

We observed several mutations in the C-terminal domain of the reverse transcriptase (amino acids 293–560): A371V (63.37%), G335D (76.24%) and E399D (10.89%). Recent studies have shown that these mutations are associated with the emergence of resistance to NRTI and NNRTI drugs. Brehm and al. showed that mutations A371V and Q509L, in association with TAMs, lead to a significant increase in resistance to zidovudine and cross-resistance to lamivudine and abacavir, but not to stavudine or didanosine³⁹. G335D if associated with TAMs also causes a surge of resistance to zidovudine⁴⁰. E399D has also been associated with resistance to zidovudine and NNRTI⁴¹. The high prevalence of these mutations observed in our study raises the question of the role of these polymorphisms in non-B subtypes and whether they could contribute to increasing resistance to first-line therapies.

In our study, the overall prevalence of primary resistance in Mali was 28.70%. This increase in the rate of primary drug resistance in Mali is worrisome in the context of the limited treatment options for first line therapy. It is therefore necessary to regularly monitor the development of primary resistance in Mali, and in other resource-limited countries to better inform our treatment strategies.

Table 1: Patients characteristics

Characteristics	Patients
Number	101
Women	76%
Men	24%
Age*	35.41 (years)
VL*	400,000 copies/ml
CD4*	135 cells/mm ³
CD4<200	67%
200-350	21%
>350	12%

VL: Viral load

[Type text]

Figure 1: Frequency of subtype for 101 subjects.

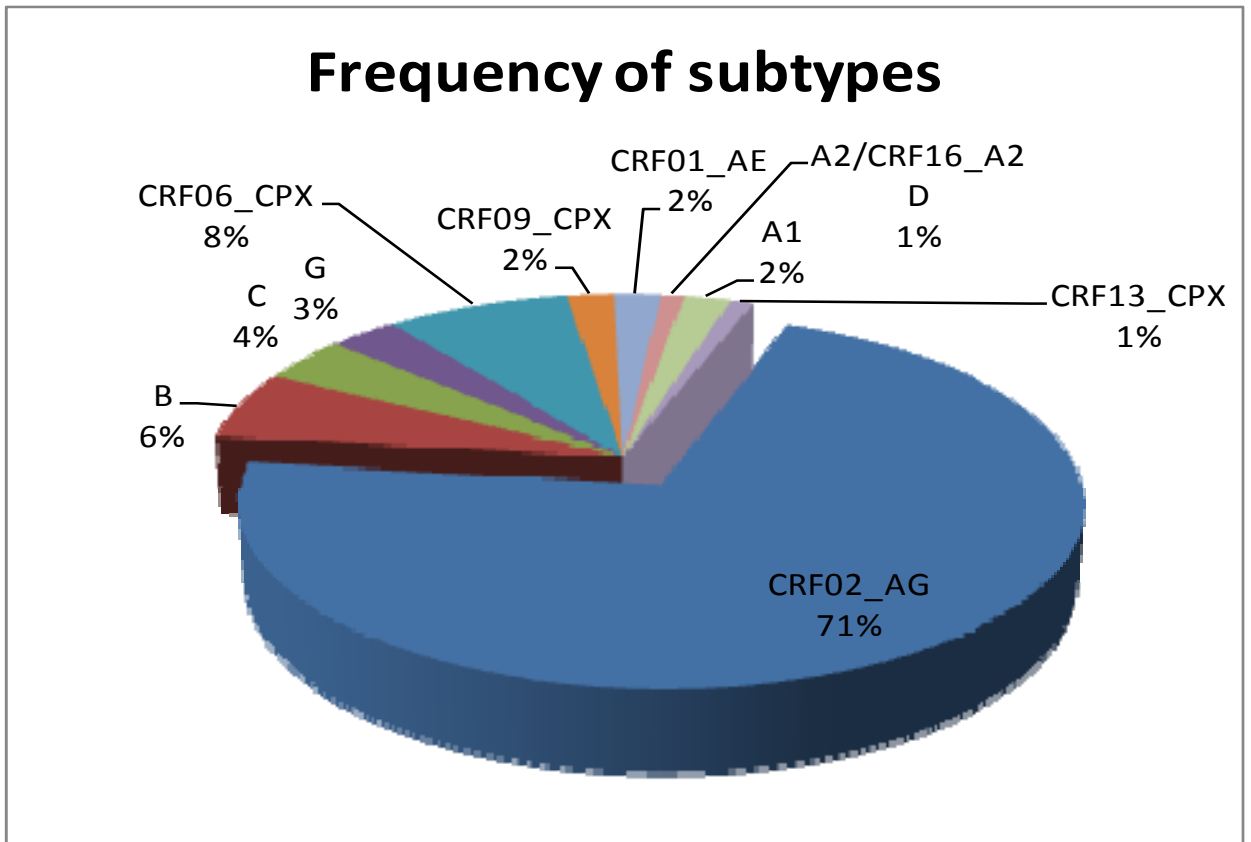


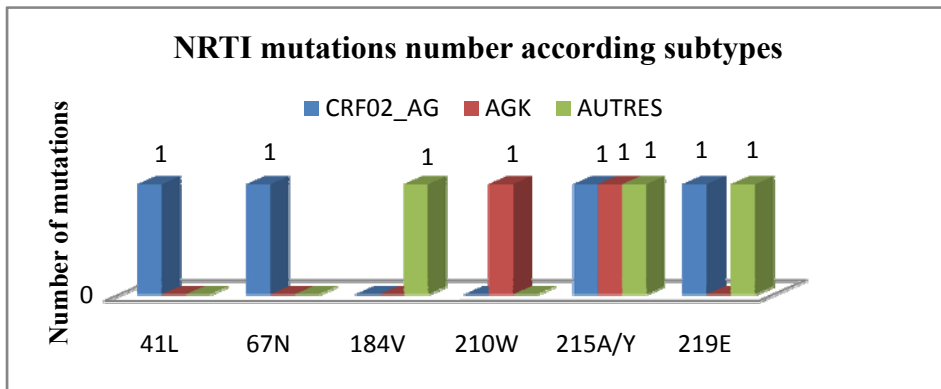
Table 2: List of 29 patients with at least one resistance mutations to one of 3 drug class

(NRTI, NNRTI or PI), - indicates no mutation

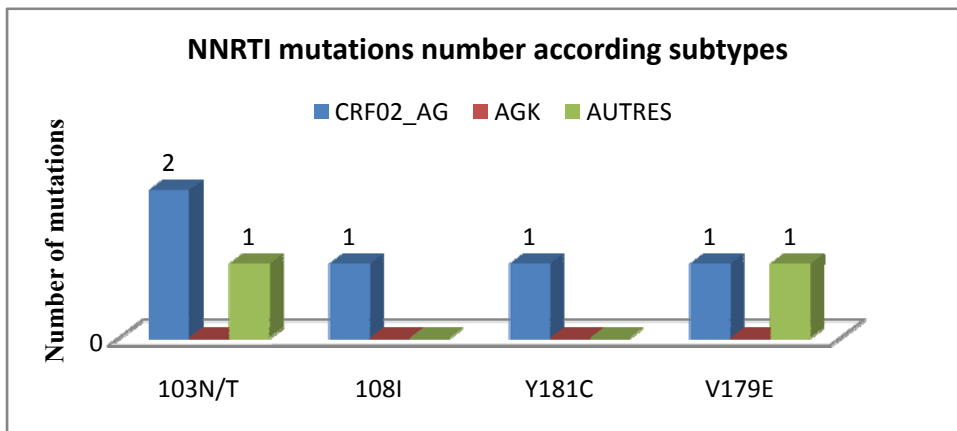
Isolates	Clades	NRTI mutations	NNRTI mutations	PI mutations
GT2005	G	M41L, T215Y, 184V	K103N	-
GT2013	CRF02_AG	-	K103N	-
GT2021	CRF02_AG	-	-	L10I
GT2027	CRF02_AG	-	V108I	-
GT2030	CRF09_CPX	-	-	L10I
GT2034	CRF02_AG	-	-	L10V
GT2044	C	K219E	-	-
GT2045	CRF06_CPX	L210W, T215A	-	L10I
CE3001	CRF02_AG	-	-	L10I
CE3002	CRF01_AE	-	-	L10V
CE3003	CRF02_AG	-	-	L10I
CE3006	CRF02_AG	-	-	L10V
CE3012	CRF02_AG	D67N, K219E	-	-
CE3013	CRF02_AG	-	-	L10V
CE3015	A1	-	-	L10I
CE3017	CRF02_AG	-	-	L10V
CE3020	CRF02_AG	-	K103T	-
CE3033	CRF06_CPX	-	-	L10I
CE3037	CRF01_AE	-	-	L33F
CE3049	CRF09_CPX	-	-	L10I
CE3053	CRF02_AG	-	-	L10V
PG1002	CRF02_AG	-	-	L10V
PG1003	CRF02_AG	-	-	L10V
PG1008	CRF02_AG	T215/A	-	-
PG1011	CRF02_AG	-	-	L10V
PG1012	CRF02_AG	-	Y181C	-
PG1013	CRF02_AG	-	V179E	-
PG1019	CRF02_AG	-	-	L10V
PG1021	CRF02_AG	-	-	L10I

Figure 2: A) Number of mutations (NRTIs) according subtypes B) frequency of mutations (NNRTI) according to the subtypes and C) frequency of mutations (PI) according to the subtypes. The results are presented at percentage.

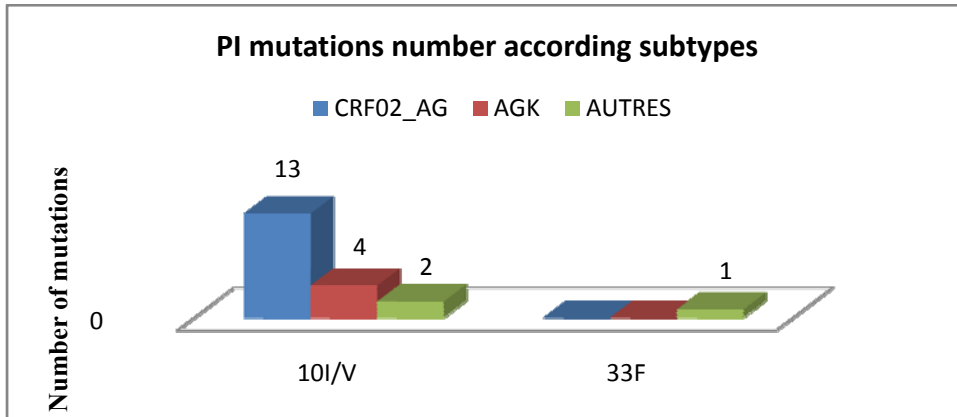
A



B



C



References

1. Laurent C C, Kouanfack S, Koulla-Shiro N, et al. Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1 infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. *Lancet*.2004; 364:29-34.
2. Lange JM, Perriens J, Kuritzkes D, et al. What policymakers should know about drug resistance and adherence in the context of scaling-up treatment of HIV infection. *AIDS*. 2004 Jun;18 Suppl 3:S69-74
3. Montes B, Vergne L, Peeters M, et al. Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;35:329–336.
4. Deshpande A, Recordon-Pinson P, Deshmukh R, et al. Molecular characterization of HIV type 1 isolates from untreated patients of Mumbai (Bombay), India, and detection of rare resistance mutations. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004. 20: 1032–1035.
5. Turriziani O, Russo G, Lichtner M, et al. Study of the genotypic resistant pattern in HIV-infected women and children from rural west Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Jun;24(6):781-5.
6. Politique et protocoles de prise en charge antirétrovirale du VIH/SIDA. Janvier 2006 Ministère de la Santé du Mali, Secrétariat Général et Comité Sectoriel de Lutte contre le SIDA.
7. Derache A, Maiga AI, Traore O, et al. Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(3):456-63.

8. Derache A, Traore O, Koita V, et al. Genetic diversity and drug resistance mutations in HIV type 1 from untreated patients in Bamako, Mali. *Antivir Ther.* 2007; 12(1):123-9
9. Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, et al. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003; 33(3):336-42.
10. Kinomoto M, Appiah-Opong R, Brandful JA, et al. HIV-1 proteases from drug-naive West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis.* 2005;41(2):243-51.
11. Quan Y, Brenner BG, Marlink RG, et al. Drug resistance profiles of recombinant reverse transcriptases from human immunodeficiency virus type 1 subtypes A/E, B, and C. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003;19(9):743-53.
12. Brenner B, Turner D, Oliveira M, et al. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS.* 2003;17(1):F1-5.
13. Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D, et al. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):2159-65.
14. Sylla M, Chamberland A, Boileau C, et al. Characterization of drug resistance in antiretroviral-treated patients infected with HIV-1 CRF02_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso. *Antivir Ther.* 2008;13(1):141-8.
15. WHO. Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings: treatment guidelines for a public health approach—2003 revision. Geneva: World Health Organization, 2003. Available at:

http://www.who.int/hiv/pub/prev_care/en/arvrevision2003en.pdf (accessed June 7, 2004).

16. Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, et al. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA*. 2002 Jul 10;288(2):181-8.
17. Vergne L M, Peeters E, Mpoudi-Ngole A, et al. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:3919-25.
18. Booth CL, Geretti AM: Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59(6):1047-56.
19. Nyombi BM, Holm-Hansen C, Kristiansen KI, et al. Prevalence of reverse transcriptase and protease mutations associated with antiretroviral drug resistance among drug-naïve HIV-1 infected pregnant women in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania. *AIDS Res Ther*. 2008; 21;5:13.
20. Agwale SM, Zeh C, Paxinos E, et al. Genotypic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 in antiretroviral drug-naïve Nigerian patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006; 22:22–6.
21. Pillay V, Ledwaba J, Hunt G, et al. Antiretroviral drug resistance surveillance among drug-naïve HIV-1-infected individuals in Gauteng Province, South Africa in 2002 and 2004. *Antivir Ther*. 2008; 13(2):101-7.
22. Vidal N, Mulanga C, Bazepeo Se, et al. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS Res Hum Retroviruses*. (2006) 22:202–6.

- 23.** Toni TD, Recordon-Pinson P, Minga A, et al. Presence of key drug resistance mutations in isolates from untreated patients of Abidjan, Côte d'Ivoire: ANRS 1257 study. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003;19(8):713-7.
- 24.** Bonfim I, Sousa B, Lima A, et al. Resistance to antiretroviral in drug-naive HIV-1 infected patients in São Tome e Príncipe. In: 4th European HIV Drug Resistance Workshop, Abstract 26 (2006) Monte Carlo.
- 25.** Chaix M L D, Descamps M, Harzic V, et al. Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *AIDS*. 2003; 17:2635-43.
- 26.** Perno CFA, Cozzi-Lepri C, Balotta F, et al. Secondary mutations in the protease region of human immunodeficiency virus and virologic failure in drug-naive patients treated with protease inhibitor-based therapy. *J Infect Dis*. 2001; 184: 983-991.
- 27.** Marcelin AG, Flandre P, de Mendoza C, et al. Clinical validation of saquinavir/ritonavir genotypic resistance score in protease-inhibitor-experienced patients. *Antivir Ther*. 2007;12(2):247-52.
- 28.** Marcelin AG, Flandre P, Molina JM, et al. Genotypic resistance analysis of the virological response to fosamprenavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients in CONTEXT and TRIAD clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Dec;52(12):4251-7.
- 29.** Grant PEC, Wong R, Rode R, et al. Virologic response to lopinavir-ritonavir-based antiretroviral regimens in a multicenter international clinical cohort: comparison of genotypic interpretation scores. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 ; 52: 4050-4056.

- 30.** Para MF, Glidden DV, Coombs RW, et al. Baseline human immunodeficiency virus type 1 phenotype, genotype, and RNA response after switching from long-term hard-capsule saquinavir to indinavir or soft-gel-capsule saquinavir in AIDS clinical trials group protocol 333. *J Infect Dis.* 2000;182(3):733-43.
- 31.** Vora S, Marcelin AG, Günthard HF, et al. Swiss HIV Cohort Study: Clinical validation of atazanavir/ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *AIDS.* 2006; 20(1):35-40.
- 32.** Baxter JD, Schapiro JM, Boucher CA, et al. Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. *J Virol.* 2006; 80(21):10794-801.
- 33.** Nadembega WM, Giannella S, Simpore J, et al. Characterization of drug-resistance mutations in HIV-1 isolates from non-HAART and HAART treated patients in Burkina Faso. *J Med Virol.* 2006; 78(11):1385-91.
- 34.** King MSR, Rode I, Cohen-Codar V, et al. Predictive genotypic algorithm for virologic response to lopinavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 3067-3074.
- 35.** Rhee SYJ, Taylor G, Wadhwa A, et al. Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 17355-17360.
- 36.** Zolopa AW, Towner D, Butcher S, et al. Resistance profile after viral rebound on atazanavir-containing therapy: focus on protease inhibitor-naive subjects in the IMPACT study (BMS AI424-128). *HIVDRW2007.*

- 37.** Delaugerre CD, Mathez G, Peytavin H, et al. Key amprenavir resistance mutations counteract dramatic efficacy of darunavir in highly experienced patients. *AIDS*. 2007; 21: 1210-1213.
- 38.** Adjé-Touré C, Bilé CE, Borget MY, et al. Polymorphism in protease and reverse transcriptase and phenotypic drug resistance of HIV-1 recombinant CRF02_AG isolates from patients with no prior use of antiretroviral drugs in Abidjan, Côte d'Ivoire. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 34: 111-3.
- 39.** Brehm JH, Koontz D, Meteer JD, et al. Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 3'-azido-3'-dideoxythymidine. *J Virol*. 2007; 81(15):7852-9.
- 40.** Nikolenko GN, Delviks-Frankenberry KA, Palmer S, et al. Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 2;104(1):317-22.
- 41.** Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, et al. Update of the Drug Resistance Mutation in HIV-1: Spring 2008. *Top HIV Med*. 2008 Mar-Apr;16(1):62-8.

Antivir Ther. 2008;13:141–148

Short communication

2.3 Characterization of drug resistance in antiretroviral treated patients infected with HIV-1 CRF02_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso

Annie Chamberland^{1,2†}, Mohamed Sylla^{1†}, Catherine Boileau³, Hamar A Traoré⁴, Souleyman Ag-Aboubacrine⁴, Mamadou Cissé⁵, Samuel Koala⁶, Joseph Drabo⁷, Ismael Diallo⁷, Pascal Niamba⁷, Daniel Tremblay-Sher¹, Nimâ Machouf^{3,8}, Sélim Rashed⁹, David C Nickle¹⁰, Vinh-Kim Nguyen^{3,8} and Cécile L Tremblay^{1, 2*} on behalf of the ATARAO group¹

¹Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada

²Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada

³Département de Médecine sociale et préventive, Université de Montréal, Montréal, Canada

⁴Hôpital national du Point-G, Bamako, Mali

⁵CÉSAC, Bamako, Mali

⁶Centre Oasis/AAS, Ouagadougou, Burkina Faso

⁷Centre hospitalier national Yalgado Ouédraogo, Ouagadougou, Burkina Faso

⁸Clinique l'Actuel, Montréal, Canada

⁹Unité de Santé Internationale, Université de Montréal and Centre Hospitalier

Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada

¹⁰Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle,

Washington, USA

†These authors contributed equally to this manuscript

[Type text]

Background: In a multicentred cohort of patients on antiretroviral therapy (ART) in Burkina Faso and Mali, we analysed the prevalence of HIV drug resistance mutations in patients failing a modified directly observed therapy (mDOT) protocol.

Methods: Patients on ART >6 months and with viral load (VL) >500 copies/ml were enrolled in a mDOT protocol. Genotypic resistance testing was performed on pre- and post-mDOT plasma samples of patients who still had VL >500 copies/ml after mDOT.

Results: Eight hundred and one patients from seven sites participated in the study. One hundred and thirteen patients (14.1%) had VL >500 copies/ml. Most patients were treated with lamivudine along with zidovudine or stavudine and efavirenz or nevirapine. Genotypes were available for 46 patients. The predominant HIV-1 subtypes were CRF02_AG in 26 (56.5%) and AGK/K/AK in 12 (26.1%) patients. The prevalence of drug resistance mutations by class were as follows for nucleoside reverse transcriptase inhibitors: 184I/V (82.6%), 215Y/F (32.6%), 219E/Q (19.6%), 70R (19.6%), 67N (21.7%), 41L (15.2%) and 151M (2.2%). For non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors the prevalence was: 103N (50%) and 181C/I (19.6%). Phylogenetic analysis showed that, although the genetic distances were small among isolates, there was no clustering of a particular subtype in a specific region and that the high prevalence of AGK subtype in our drug-resistant population was not due to a circulating resistant strain.

Conclusion: Although CRF02_AG is the dominant clade in the Burkina Faso/Mali region, isolates with subtype K reverse transcriptase were frequent in our cohort. Drug resistance

mutation pathways in subtype K reverse transcriptase need to be further evaluated in a larger cohort of non-B HIV-infected individuals.

Introduction

A rapidly growing number of HIV-infected individuals in developing countries now have access to antiretroviral therapy (ART). The World Health Organization estimated that, as of March 2006, 1.3 million people were receiving ART in Africa in middle- and low income countries, a figure that more than tripled over the past 2 years [1]. These numbers are likely to expand even more rapidly as large interventions such as the US Presidential Emergency Program for AIDS Relief (PEPFAR), UNAIDS, the Global Fund and other organizations ramp up operations. As antiretroviral drugs are more widely used in countries where non-B HIV-1 subtype infections are prevalent, it is important to assess the drug resistance mutation pathways emerging among various subtypes. Some data suggest that non-B isolates show a different pattern of resistance mutations than the B subtype [2–5]. Reports have shown that mutation V106M confers resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in subtype C HIV [6, 7]. Furthermore, the D30N mutation is not preferentially selected by HIV-1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir [8]. Differential evolution of resistance patterns among subtypes has important implications for clinical management and drug development. Differences in mutational pathways by different clades could affect our choices of first- and second-line regimens. They could also shed light on the molecular mechanisms by which HIV acquires and maintains resistance to antiretroviral agents. However, little data exist on drug resistance mutation pathways in non-B subtypes. Here, we describe a group of patients in Burkina Faso and Mali in Western Africa. These patients harboured non-B subtypes with resistance to antiretrovirals (ARVs), and were studied in the context of an intervention to support

adherence to treatment. We report the specific subtypes and mutations found as well as treatment histories for the patients from whom they were derived.

Methods

Study population and design

Eight hundred and one patients from Mali (n=398) and Burkina Faso (n=403) were enrolled in a study to assess adherence to ART. Viral loads were measured in all 801 patients, who had received ARVs for >6 months. In 113 patients whose viral load was >500 c/ml, a 1-month adherence intervention (modified directly observed therapy; mDOT) was proposed; 77/113 patients agreed and completed the intervention. Viral load was measured 1 month after the intervention. Genotypic analysis of drug resistance mutations was performed before and within a month following the completion of the adherence intervention.

Viral load

Viral load was measured with COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions.

Genotypic analysis

Plasma viral RNA was extracted using QIAamp Viral Mini Spin Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and concentrated three times, according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed using SuperScript III One-Step reverse transcriptase (RT)-PCR System with Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with primers covering Gag–Pol domains (Gag-1824F, T_m 65°C and Pol-4295R, T_m 63.5°C) using a 30 min cycle at 50°C. Amplification conditions were as follows: an initial 2 min cycle at 94°C for denaturation, 40 cycles with three steps (15 s at 94°C, 30 s at 58°C and 5 min at 68°C) and a final extension cycle for 5 min at 68°C. Samples with low viral load or that were difficult to amplify were submitted to nested PCR with primers (Gag-1824F and Pol-4002R or Pol-2137F and Pol-4295R) in order to obtain the expected band. PCR products were separated on a 1% agarose gel to confirm the presence of a 2020 bp band. They were purified using QIAprep Spin Miniprep Kit 50 (Qiagen). Sequencing was performed at Génome Québec (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Quebec, Canada) using six primers covering *pol*. All nucleotide sequences were submitted to GenBank and provided with accession numbers (DQ001615–DQ991673, EF010976, EF010977, EF525643–EF525650, EF525652–EF525667 and EF588323–EF588326).

Data analysis

Sequences were analysed using Sequencer 4.5 from Gene Codes Corporation software (Ann Arbor, MI, USA). Analysis of drug resistance mutations and subtype analysis were performed using the Stanford University HIV Resistance Database. Results were confirmed using the Los Alamos HIV blast tool (http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/BASIC_BLAST/basic_blast.html; Los Alamos National Laboratory [LANL]). The comparison of drug mutations according to subtype was analysed using a nonparametric statistical analysis, using Mann–Whitney test on SPSS 12.0 for Windows. (Chicago, IL, USA).

Phylogenetic analysis

Sequences were aligned using Clustal W version 1.83 [9] followed by manual alignment editing using BioEdit version 7.0.4.1. Pairwise alignment parameters were set to the dynamic ‘slow-accurate’ programming, using 10 as the gap-opening penalty and 0.1 as the gap extension penalty. Multiple alignment parameters included a gap extension penalty equal to 0.2 [10]. Subtype reference sequences were obtained from LANL HIV sequence database (<http://www.hiv.lanl.gov/>). We estimated a maximum likelihood (ML) tree with our data (AG and AGK) and each available sequence from the LANL HIV database from the same subtypes and gene region (97 sequences). Phylogenetic analysis was done by first using PAUP* to estimate a starting NJ tree and then used the swapping algorithm SPR under an HKY+G+I model of evolution.

[Type text]

Population substructure

We used two methods to determine whether our study population was distinct from previously described AG and AGK clades. First, we used a cladistic-based method [11, 12] to determine if HIV sequences from within our study population had a history of migration between the local population and AG and AGK strains found elsewhere. We therefore estimated a maximum likelihood (ML) tree with our data (AG and AGK) and as many database sequences from the LANL HIV database of the same subtypes and gene region (97 sequences) using PAUP*(Sinaver Associates Inc. Sunderland, MA, USA). [13]. We then mapped the number of potential migration events between populations onto the phylogeny using the software program MacClade [14]. Next, we used a genetic distance-based method called nearest-neighbour statistic (Snn), which is reported to be one of the most statistically powerful methods to detect a restriction of gene flow among populations using genetic distance data [15]. This method enumerates the number of individuals that are the closest in terms of genetic distance (that is, nearest neighbour [nn]) to each individual sampled from both putative populations and then simply sums the number of nn individuals within each populations divided by the total number of nn across all putative groups arriving at the Snn test statistic. *P*-values are determined non-parametrically by randomizing the genetic distance between individuals.

Results

To be eligible for ART, most patients had to have CD4+ T-cell counts ≤ 200 cells/mm³. Most patients were receiving a NNRTI plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), with stavudine, lamivudine and nevirapine being the most commonly used drugs. Of the 801 patients enrolled on therapy, viral load was measured in 798 patients. After 6 months of therapy, 598 patients (74.9%) had plasma HIV-1 RNA < 50 copies/ml. Adherence intervention, including counselling and home visits, was performed in 77/113 patients with viral load > 500 copies/ml at that time. Genotyping was attempted in these 77 patients before and after this intervention. Thirteen more patients achieved an undetectable viral load after this intervention; consequentially, a total of 611 patients had plasma HIV-1 RNA levels < 50 copies/ml (76.5%). Resistance testing was successfully performed in 46/113 patients with viral load > 500 copies/ml. Some viral sequences could not be amplified because of the poor quality of the samples. Characteristics of these patients are summarized in Table 1. In both countries, the predominant form of virus was the circulating recombinant form CRF02_AG, accounting for 56.5% of the patients tested, followed by CRF_AGK in 26.1% of patients. These viruses were composed of AG subtype sequences in protease and K sequence in RT. One patient's virus was K subtype over both protease and RT and another patient's was AK. Other subtypes represented in single patients were: A, C, AGG (which differs from our other AGs only in the protease domain with clade G), GH, BD and B; CRF01_AE was found in two patients. Some previous reports indicated that CRF02_AG is common in Western Africa [16–18], whereas subtype K is rare [18]. Most of our AGK isolates were from Burkina Faso (8/10), which is consistent with recent reports

[Type text]

describing CRF 06_cpx (a mosaic of A, G, J and K subtypes) and CRF 09_cpx in this country [19, 20]. There was no known epidemiological link among the patients as assessed by our demographic questionnaire and our phylogenetic analysis. However, the genetic distances between all AGK isolates were small. Our subtype K isolate, originating from Mali, clustered with the only two other subtype K isolates described in the literature (from Cameroon and Congo) as well as some CRF 09_cpx strains. Isolates from Mali and from Burkina Faso did not cluster preferentially within a country (Figure 1).

Resistance mutations found in the 46 patients are shown in Figure 2. The most common NRTI resistance mutation encountered was the 184I/V (82.6% of patients). Thymidine-associated mutations (TAMs) were detected in 52.1% of patients: 21.7% had mutations characteristic of the TAM1 pathway (M41L, L210W, T215Y) and 30.4% of the TAM2 pathway (D67N, K70R, T215F, K219Q/E). Of interest, a greater proportion of mutations associated with the TAM2 pathway was observed in patients harbouring viruses of the AGK or K subtypes compared with CRF02_AG subtypes (41.7% versus 19.2%, $P=0.150$), although this trend was not statistically significant perhaps due to the small sample size. One patient had the Q151M MDR mutation complex. Very little viral evolution occurred between the time points. Only three patients acquired additional NRTI mutations between the two time points (Figure 3a). Groups of 16 patients each were on NNRTI containing regimens, either nevirapine or efavirenz. However, 36 patients had NNRTI resistance-associated mutations: 31/32 patients on an NNRTI-containing regimen had NNRTI-associated mutations, and three patients on NRTI-only regimens and two patients on a PI-containing regimen had NNRTI mutations, possibly due to previous exposure to an

NNRTI. K103N was the most common (50%), followed by Y181C (19.6%), P225H (19.6%), G190A/S (17.4%) and K101E (13%). The K103N mutation was more common in CRF02_AG infections as opposed to CRF AGK/K infections (69.2 versus 33.3%, $P=0.042$). However, more patients with CRF02_AG were on efavirenz-containing regimens (56% compared with 17% of CRF AGK/K subtypes). K103N mutations were present in 13/16 (81%) patients on efavirenz-containing regimens (all of them were subtype AG), in contrast to 6/17 (35%) patients on nevirapine-containing regimens (4/5 AG and 2/8 AGK on nevirapine-containing regimens). K101E was predominantly identified in CRF AGK/K subtypes (25% versus 0% in CRF02AG subtype; Figure 3b). Eleven patients received a PI-containing regimen (indinavir). Four of them harboured PI resistance-associated mutations (G48W, I54V, V82A/T). Several polymorphisms, such as K20I and M36I and L10V/M/I, were observed.

Drug resistance evolution

We used two methods to ascertain the probability that the observed drug resistance patterns in the population we studied was driven by transmitted drug resistant virus or by independent evolution of the drug-resistant genotypes. To test this hypothesis, we compared our observed number of drug-sensitive genotypes evolving into drug-resistant genotypes on the ML tree with the null hypothesis of random independent evolution of drug resistance. If drug resistance mutations were being transmitted in the population, we would expect our observation to be significantly outside the null distribution. To obtain the *P*-value, we compared the observed number of drug resistance mutations evolving on the ML tree to our null hypothesis, which is the distribution of same evolutionary measure across 1,000 independent random trees given the drug resistance mutations we observed. The second method we used to determine if drug resistance was being transmitted among the individuals within our local study population was to derive ML estimates of the ancestral state of each independent cluster of viruses found in our study population. We found that viruses in our study population are genetically distinct from previously described strains (Figure 1). First, we found that the ML tree topology supports the notion that our population is more isolated than we would expect by chance alone ($P < 0.001$). We observed 18 migration events between our AGK and AG variants and similar CRFs found in the LANL database. We also found that the genetic distance data supported the same conclusion. The S_{nn} value was 0.64 and the probability of observing a value this small or smaller under the null of free gene flow is $P = 0.013$. Our cladistic-based method revealed that the number of times drug resistance evolved in our population appears to be no

different than random expectation. If the population of infected HIV individuals were transmitting drug-resistant viruses to each other at appreciable frequencies, we would see many fewer evolutionary events on the phylogeny. The ancestral state would harbour drug resistance mutations and all of the descendants from the ancestor would also be drug resistant, thus requiring few changes on the phylogeny to adapt to this selective force. We observed 57 changes from drug-sensitive to drug-resistant genotypes in the AG dataset, which was no different than random expectation ($P=0.7$). In the AGK dataset, we observed 17 changes from drug-sensitive to drug-resistant genotypes ($P=0.058$). The marginal significance for the AGK set was perhaps due to the smaller sample size decreasing the statistical power. Ancestral states estimated on the ML tree were drug sensitive, further supporting the notion that antiretroviral drug resistance arrived in this population due to *de novo* mutations.

Discussion

This study is the largest to date on viruses encoding subtype K RT and reports some intriguing findings. First, in our group experiencing virological failure, patients with HIV AGK subtype were common. The epidemiological significance of this finding is difficult to ascertain given that the majority of the 801 patients sampled had undetectable viral loads and, therefore, their subtype could not be determined. The prevalence of CRF_AGK in the Western African countries of Burkina Faso and Mali has not been extensively studied [16, 18, 21]. According to our phylogenetic analysis, it is unlikely that the high prevalence of AGK in our drug-resistant patients was due to primary infection with a circulating resistant

[Type text]

strain. Furthermore, the patterns of drug resistance mutations differed among patients. Although eight of the nine patients were cared for at the same site, they came from different neighbourhoods. Furthermore, our phylogenetic analysis illustrates that although the genetic distances among the isolates are small, there was no clustering of a particular subtype in a specific region. In our population, subtype K RT isolates tended to evolve NRTI resistance predominantly through the TAM2 pathway unlike our CRF02_AG strains and previous observations on subtype B strains [22, 23]. This suggests that there may be differences in the molecular evolution of resistance in this clade. In subtype B, TAM1s are more common than TAM2s, possibly because of long-term trends in sequential use of ARVs, which has resulted in TAM1s evolving over time or possibly due to a fitness advantage conferred by certain mutations, such as T215Y or L210W, in a TAM1 background [24]. In our cohort of patients, treatment regimens were similar among subtypes. Furthermore, none of the patients who were on a stavudine regimen developed any TAMs. Therefore, the differences observed in the predominance of TAM2s could not be attributed to stavudine. Further evidence supporting the hypothesis that AGK RT may differ in its molecular evolution toward resistance stems from the finding that NNRTI-resistant AGK mutants were more likely to have Y181C than K103N, whereas the converse was true for CRF_AG02 mutants. However, patients with CRF02_AG had been more exposed to efavirenz-containing regimens. Six patients did not have any resistance mutations, although only one of them was reported to be nonadherent. At the second time point, 20/46 patients harbouring resistance mutations had NNRTI mutation as well as TAMs and the 184V mutation, which compromised their future therapeutic options. The other 20 patients had various patterns of mutations: 14 patients had NNRTI and the 184V

mutations, two only had the 184V mutation, one had NNRTI plus TAM, one had the Q151M complex and NNRTI mutations, one had 69S plus NNRTI mutations and one only had NNRTI resistance mutations. This is the first analysis of the molecular evolution of a group of subtype K RT under ARV selective pressure. Our data suggest that subtype K viruses may evolve differently from other subtypes after exposure to RT inhibitors. This may have important consequences on treatment options and second-line regimens as more drugs become available to individuals in resource-poor settings. These findings indicate that further molecular studies in AGK viruses are warranted.

Acknowledgements

We wish to acknowledge G Bélanger-Jasmin for her laboratory support, the entire ATARAO team and the patients from Mali and Burkina-Faso for participating in this study.

Support

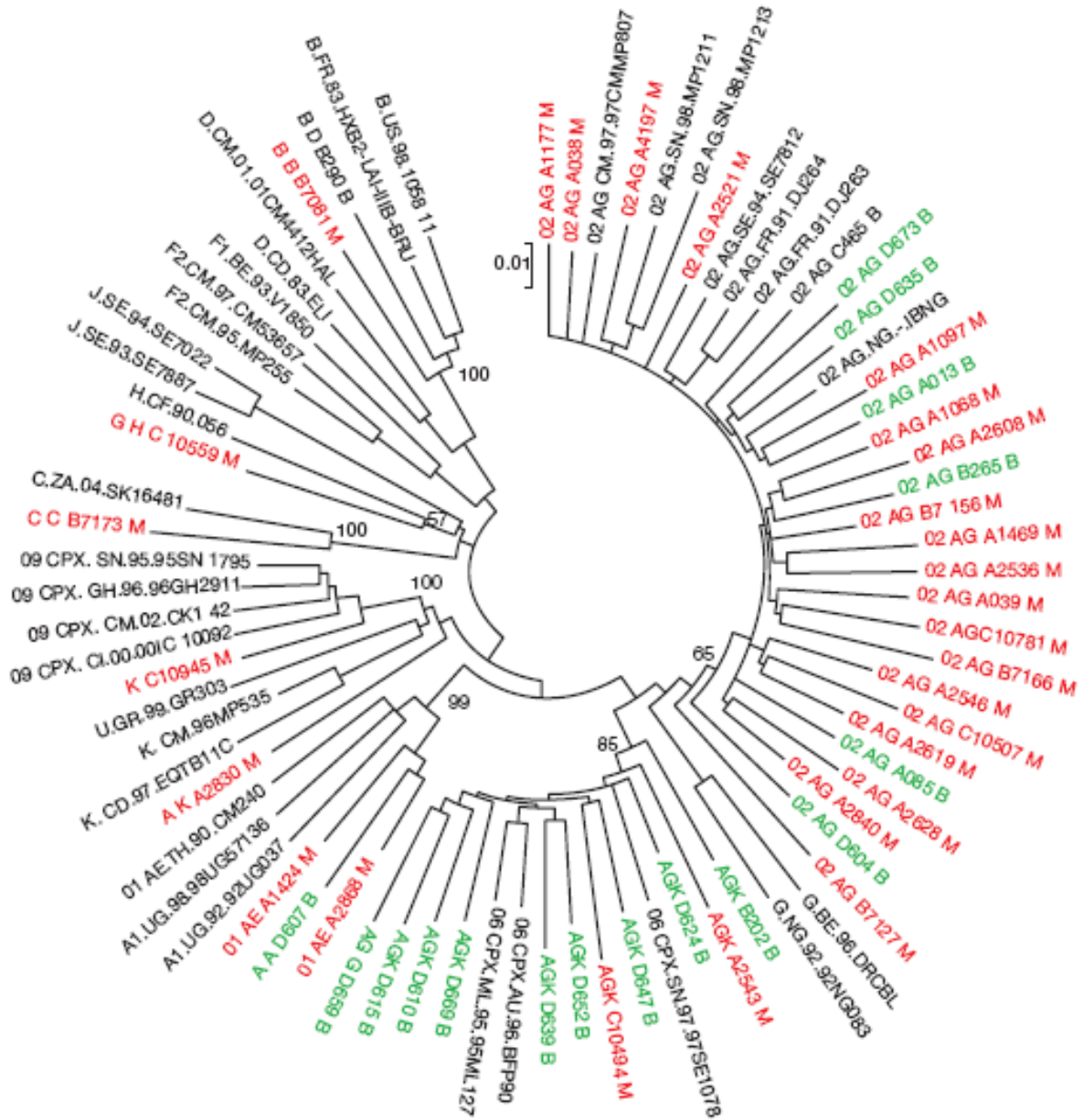
This work was supported by CIHR grant no 24141 and US Public Health Service Center grant P30 27757 to Dr James I Mullins for the support of DCN. This work was also supported by an unrestricted grant from Boehringer Ingelheim and le Réseau FRSQ-SIDA. CLT and VKN are CIHR New Investigators.

Table 1. Patient characteristics

	CRF02_AG	CRF_AGK/K	Others	Total
Female, <i>n</i> (%)	11 (44)	10 (40)	4 (16)	25 (100)
Male, <i>n</i> (%)	12 (57.1)	4 (19.04)	5(23.8)	21(100)
Subtype distribution, <i>n</i> (%)	26 (56.5)	12 (26.1)	8 (17.4)	46 (100)
Mean CD4 ⁺ T-cell count, cells/mm ³	161	210	197	189 (100)
Drug regimen, <i>n</i> (%) ^a				
ZDV + 3TC + NVP	5 (19.2)	5 (41.6)	2 (25)	12 (100)
ZDV + 3TC + EFV	13 (50)	1 (8.3)	0	14 (100)
D4T + 3TC + NVP	0	3 (25)	1 (12.5)	4 (100)
D4T + 3TC + EFV	2 (7.7)	0	0	2 (100)
DDI + ZDV + 3TC	1 (3.8)	1 (8.3)	1 (12.5)	3 (100)
DDI + D4T + IDV	2 (7.7)	1 (8.3)	0	3 (100)
DDI + ZDV + IDV	0	0	1 (12.5)	1 (100)
D4T + 3TC + IDV	1 (3.8)	1 (8.3)	1 (12.5)	3 (100)
ZDV + 3TC + IDV	2 (7.7)	0	1 (12.5)	3 (100)
DDI + 3TC + IDV	0	0	1 (12.5)	1 (100)

^aDDI, didanosine; D4T, stavudine; EFV, efavirenz; IDV, indinavir; NVP, nevirapine; 3TC, lamivudine; ZDV, zidovudine.

Figure 1. Phylogenetic analysis of 46 viral sequences



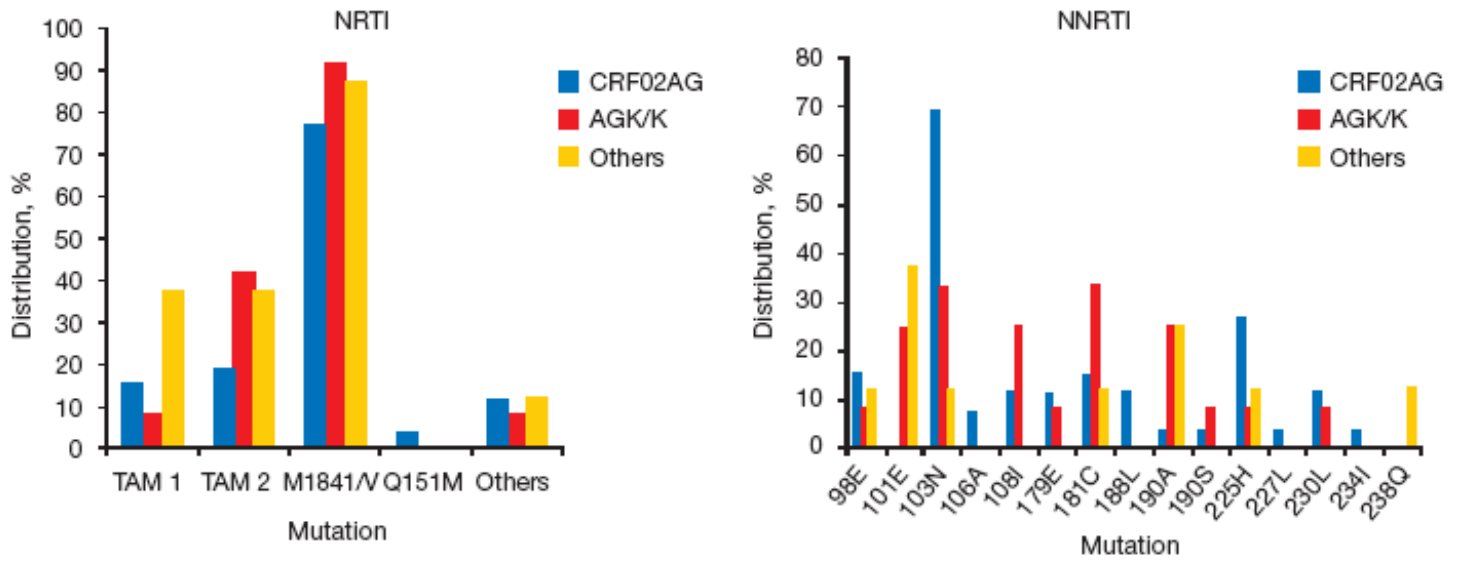
Sequences from Mali are shown in red and from Burkina Faso in green. Reference sequences are shown in black font. Bootstrap values >50 are indicated.

Figure 2. NRTI and NNRTI resistance mutations identified in 46 isolates

Clade	Isolate	NRTI																	NNRTI											GenBank number												
		41L	44D	67N	67T	69N	69D	69S	70R	74V	75I	115F	116Y	151M	184I	184V	210W	215F	215I	215Y	219E	219N	219Q	333E	98G	101E	103N	103A	108I	179E	181C	189H	188L	190A	190S	225H	227L	230I	341I	238Q	1st/2nd TP	
02AG	A1068																																							DQ991621/22		
02AG	A2521																																								DQ991625/26	
02AG	A2546																																								DQ991629/30	
02AG	A2640																																								DQ991637/38	
02AG	A2606																																								DQ991631/32	
02AG	A2626																																								DQ991633/34	
02AG	B7127																																								DQ991643/44	
02AG	B7166																																								DQ991645/46	
02AG	C10781																																								DQ991651/52	
02AG	C10507																																								DQ991649/50	
02AG	A4197																																								DQ991639/40	
02AG	A1097																																								EF525653/54	
02AG	A1469																																							EF525655/56		
02AG	A2536																																							EF525652/599326		
02AG	A2619																																								EF525657/58	
02AG	B7156																																								EF525659	
02AG	AD13																																							EF525643/44		
02AG	B265																																								EF525645/46	
02AG	AC38																																								DQ991615/16	
02AG	AC99																																								DQ991617/18	
02AG	C465																																								DQ991647/48	
02AG	AC65																																								DQ991619/20	
02AG	D604																																								DQ991653/54	
02AG	D635																																								DQ991663/EF508325	
02AG	D673																																								DQ991672/73	
02AG	A1177																																									DQ991623/24
AGK	A2543																																									DQ991627/28
AGK	D639																																									EF508323/24
AGK	D610																																									DQ991657/58
AGK	D647																																									DQ991664/65
AGK	D652																																									DQ991666/67
AGK	D615																																									DQ991659/60
AGK	D624																																									DQ991661/62
AGK	C10494																																									EF525660
AGK	B202																																									EF525647/48
AGK	D669																																									DQ991670/71
AK	A2630																																									DQ991635/36
K	C10945																																									EF010976/77
A-A	D607																																								DQ991655/56	
B-B	B7081																																									DQ991641/42
C-C	B7173																																									EF525661/62
01AE	A2666																																									EF525663
01AE	A1424																																									EF525664/65
G-H	C10559																																									EF525666/67
B-D	B290																																									EF525649/50
AG-G	D659																																									DQ991668/69

Black boxes correspond to mutations identified at both time points (before and 30 days after a 1 month-adherence intervention; TP), yellow boxes correspond to mutations identified at the second time point only, and pink boxes correspond to mutations identified at the first time points only. For three patients, only one time-point sequence is available. Clades in bold and italic = Mali; normal font = Burkina Faso. NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor.

Figure 3. Distribution of NRTI and NNRTI drugs resistance mutations according to subtype



NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor.

The authors declare no conflict of interests.

[Type text]

References

1. Kuehn BM. UNAIDS report: AIDS epidemic slowing, but huge challenges remain. *JAMA* 2006; 296:29–30.
2. Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 33:336–342.
3. Bussmann H, Wester CW, Masupu KV, et al. Low CD4+ T-lymphocyte values in human immunodeficiency virus-negative adults in Botswana. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:930–935.
4. Calazans A, Brindeiro R, Brindeiro P, et al. Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism. *J Infect Dis* 2005; 191:1961–1970.
5. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, et al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med* 2005; 2:e112.

6. Brenner B, Turner D, Oliveira M, et al. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Aids* 2003; 17:F1–F5.
7. Quan Y, Brenner BG, Marlink RG, Essex M, Kurimura T, Wainberg MA. Drug resistance profiles of recombinant reverse transcriptases from human immunodeficiency virus type 1 subtypes A/E, B, and C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19:743–753.
8. Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D, et al. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2159–2165.
9. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties. *Nucleic Acids Res* 1994. 22:4693–4680.
10. Kumar M, Jain SK, Pasha ST, Chattopadhyaya D, Lal S, Rai A. Genomic diversity in the regulatory nef gene sequences in Indian isolates of HIV type 1: emergence of a distinct subclade and predicted implications. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22:1206–1219.
11. Slatkin M, Maddison WP. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics* 1989; 123:603–613.
12. Slatkin M, Maddison WP. Detecting isolation by distance using phylogenies of genes. *Genetics* 1990; 126:249–260.
13. Swofford DL. PAUP* 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 2002.

14. Maddison WP, Maddison DR. MacClade - Analysis of Phylogeny and Character Evolution - Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 2001.
15. Hudson RR. A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 2000; 155:2011–2014.
16. Laurent C, Bourgeois A, Faye MA, et al. No difference in clinical progression between patients infected with the predominant human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form (CRF) 02_AG strain and patients not infected with CRF02_AG, in Western and West-Central Africa: a four-year prospective multicenter study. *J Infect Dis* 2002; 186:486–492.
17. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:184–190.
18. Triques K, Bourgeois A, Vidal N, et al. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:139–151.
19. Nadembega WM, Giannella S, Simpore J, et al. Characterization of drug-resistance mutations in HIV-1 isolates from non-HAART and HAART treated patients in Burkina Faso. *J Med Virol* 2006; 78:1385–1391.
20. Tebit DM, Ganame J, Sathiandee K, Nagabila Y, Coulibaly B, Krausslich HG. Diversity of HIV in rural Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 43:144–152.
21. McCutchan FE, Carr JK, Bajani M, et al. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology* 1999; 254:226–234.

22. Cozzi-Lepri A, Ruiz L, Loveday C, et al. Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. *Antivir Ther* 2005; 10:791–802.
23. Kuritzkes DR, Bassett RL, Hazelwood JD, et al. Rate of thymidine analogue resistance mutation accumulation with zidovudine- or stavudine-based regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 36:600–603.
24. Hu Z, Giguel F, Hatano H, Reid P, Lu J, Kuritzkes DR. Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2006; 80:7020–7027.

Accepted for publication 2 October 2007

© 2008 International Medical Press

3. Discussion

Le traitement antirétroviral a permis de réduire considérablement le taux de morbidité et de mortalité des personnes infectées par le VIH en plus d'augmenter significativement leur qualité de vie ¹⁵⁴. Malheureusement, le traitement n'est pas sans amener son lot de problèmes et de complications. Les traitements sont complexes, coûteux et les effets indésirables sont nombreux. De plus, les patients se doivent de suivre rigoureusement leur traitement puisqu'une mauvaise adhérence est associée avec l'apparition de mutations de résistance ³⁶⁷⁻³⁶⁹. Bien que les traitements permettent de maîtriser la réplication virale ainsi que d'améliorer le taux de CD4, on ne peut parler d'éradication ou de guérison dans le contexte actuel. En effet, le virus persiste sous forme latente comme le démontre le rebond spectaculaire de la charge virale lors d'interruption du traitement. Le réservoir viral est donc un obstacle majeur dans le traitement de l'infection. Mais de loin, l'outil principal que possède le virus pour déjouer toutes nos stratégies vaccinales et thérapeutiques est sa formidable diversité génétique. L'objet de cette thèse a donc été d'analyser cette diversité génétique dans deux contextes : premièrement un contexte de stratégie immuno-thérapeutique telle que le traitement précoce en primo-infection pour limiter la diversité génétique et identifier des cibles vaccinales; deuxièmement, dans le contexte de l'échappement au traitement antirétroviral chez des isolats de sous-types non-B.

Nous avons formulé l'hypothèse que l'initiation précoce du traitement pourrait limiter la diversité virale. Une diversité virale réduite, pourrait être bénéfique pour le contrôle de l'infection à long terme par le système immunitaire. En effet, lors de la réplication virale qui est exponentielle durant l'infection primaire, l'enzyme transcriptase inverse de par sa faible fidélité va introduire diverses erreurs dans le génome viral. Ces mutations entraînent

dans bien des cas, la formation de virus défectueux mais dans quelques cas, vont produire des virus pouvant échapper au système immunitaire en rendant inefficace la présentation par les CPA et la neutralisation par les anticorps. Bien que la possibilité d'éradiquer le virus dans le contexte actuel soit pratiquement impossible, il est clair qu'une population virale homogène devrait être plus facile à éradiquer qu'une population composée d'une multitude de variantes possédant des caractéristiques phénotypiques distinctes et pouvant court-circuiter les réponses immunes. Le traitement initié précocement va inhiber drastiquement la réplication virale ce qui se traduira par une évolution virale plus lente. Comme les réponses immunes évoluent plus lentement que le virus, un ralentissement de l'évolution virale pourrait donc avantager le système immunitaire et permettre un meilleur contrôle de l'infection. Aussi, puisque le réservoir se met en place au début de l'infection, le traitement précoce pourrait également circonscrire la taille du réservoir ainsi que la diversité virale contenue dans ces réservoirs.

D'un autre côté, plusieurs raisons motivent le choix de retarder le traitement. D'abord, le système immunitaire est relativement intact et est en mesure de maîtriser en partie la réplication virale tout en continuant de protéger l'hôte des micro-organismes communs. Les patients peuvent ainsi vivre quasi normalement pendant de nombreuses années sans traitement. De plus, les traitements sont coûteux et complexes. Ils requièrent une adhérence sans faille afin de limiter l'émergence de mutation de résistances et sont aussi associés à de nombreux effets secondaires importants.

Par contre, l'absence de traitement va permettre au virus de se répliquer de façon importante, et ce, durant une longue période de temps, permettant au virus de se diversifier et ainsi de générer une multitude de variantes virales. De plus, les réponses immunitaires de l'hôte vont contribuer à la diversité virale puisque le virus va se modifier afin d'échapper aux anticorps neutralisants ainsi qu'aux lymphocytes cytotoxiques. Les réponses immunitaires (CTL et anticorps neutralisants) vont également exercer une pression de sélection positive sur les variantes possédant des mutations d'échappement à ces réponses. Finalement, l'expression continue d'antigènes viraux va également produire une activation chronique du système immunitaire et éventuellement conduire à son épuisement.

Il n'y a pas consensus quant au meilleur moment pour initier la thérapie. Au cours des 10 dernières années, les lignes directrices ont été revues et corrigées à maintes reprises. Dans un premier temps, les recommandations suggéraient qu'un traitement précoce pourrait protéger le système immunitaire et ainsi retarder la progression de l'infection. Par la suite, c'est un traitement tardif, lorsque les CD4 sont inférieurs à 200 cell/mm^3 qui a été privilégié, et ce, dans le but de minimiser la toxicité associée aux antirétroviraux. Récemment, le pendule revient en faveur de traitements précoces suite à la publication d'études ayant démontré un bénéfice clinique à initier le traitement à des CD4 de plus de $350 \text{ cellules/mm}^3$ ³⁷⁰⁻³⁷⁴.

Un autre point en litige concerne l'origine de la réplication résiduelle observée dans les réservoirs viraux chez les patients sous traitement. À ce sujet, deux modes de pensée sont proposés. Une hypothèse supporte la notion que les molécules antirétrovirales parvenant à peine à maîtriser la réplication virale, il se produit de la réplication virale occasionnelle chez la majorité des patients ¹⁸⁶. Lorsque des techniques plus sensibles furent mises au point, il fut alors démontré qu'il était possible d'observer du virus plasmatique chez la majorité des patients, et ce, en tout temps, suggérant ainsi la présence de réplication à bas bruit chez la majorité des patients sous traitement ³⁷⁵. Cette réplication fait en sorte que de nouvelles cellules deviennent infectées et bien qu'une majorité de ces cellules mourront, un certain nombre d'entre elles redeviendront des cellules mémoires et ainsi réalimenteront le réservoir. Deux points majeurs viennent appuyer cette théorie. En premier lieu, il y a d'abord présence d'évolution virale chez certains patients sous traitement et pour y avoir évolution virale, il doit nécessairement y avoir de la réplication virale. Deuxièmement, la majorité des études concluent à l'effet qu'il n'y a pas ou très peu de diminution de la taille des réservoirs, et ce, même après plusieurs années de traitement. Or, si les médicaments parviennent à protéger les cellules de l'infection, au fur et à mesure de la mort naturelle des cellules contenues dans les réservoirs, nous devrions observer une diminution de la taille des réservoirs. Des molécules plus puissantes ayant un pouvoir de pénétration dans les réservoirs ainsi qu'une intensification du traitement sont donc proposées afin de stopper toute réplication virale résiduelle et ainsi empêcher l'infection de nouvelles cellules et la réalimentation du réservoir.

La seconde hypothèse, soutenue en particulier par l'équipe du Dr. Siliciano, suggère plutôt que la thérapie permet bel et bien de protéger les cellules de toute nouvelle infection et que de nouvelles molécules ou une intensification du traitement ne pourront pas stopper cette réplication résiduelle. En fait, selon eux, il n'y aurait pas véritablement de réplication résiduelle mais plutôt une libération de virus par les réservoirs. En séquençant le virus provenant de la réplication résiduelle, ils n'ont observé aucune évolution virale chez les patients ayant bien répondu aux traitements, et ce, même durant les épisodes de "blips". Seuls les patients avec une suppression virale sous-optimale démontraient des signes d'évolution^{159, 376}. Ils concluent donc qu'il n'y pas de réplication résiduelle chez les patients avec un traitement antirétroviral optimal mais plutôt une libération de virus provenant des réservoirs. De plus, ces virus n'étant pas homologues aux virus retrouvés chez les cellules mémoires latentes, ils seraient libérés à partir d'autres réservoirs viraux.

D'autres études sont donc requises afin d'améliorer nos connaissances sur ce sujet. Il est fort important d'élucider l'effet du traitement sur la progression de la maladie et d'évaluer si l'initiation précoce procure un avantage à long terme pour les patients au niveau de la taille et de la diversité virale contenue dans les réservoirs. Il est également nécessaire d'identifier d'où proviennent les virus résiduels, à savoir s'ils sont libérés par les réservoirs, et ce, sans évidence de réplication et donc d'évolution ou s'il s'agit bel et bien de réplication à faible niveau associée à une augmentation de la diversité. Toutefois, il existe peu d'études sur l'effet d'initier un traitement antirétroviral tôt suivant l'infection sur la taille et le déclin des réservoirs ainsi que sur l'évolution de la diversité virale. Alors que l'effet du traitement sur la diversité virale n'est pas bien documenté, les conséquences

même de cette diversité ne le sont pas davantage. Si certains auteurs semblent démontrer que les rares patients qui contrôlent le virus naturellement sans médicaments (contrôleurs élités) auraient une diversité virale plus importante due à de fortes réponses immunitaires, certaines autres études démontrent plutôt une diversité réduite chez les contrôleurs élités^{362, 376-378}. De plus, la présence de plusieurs variantes lors de la primo infection est associée à une progression rapide de la maladie. Finalement, on observe vers la fin de la maladie une diminution de la diversité associée avec une diminution marquée des CD4.

Afin d'éclaircir le sujet, nous avons choisi d'observer l'effet du traitement précoce sur le déclin du réservoir ainsi que sur l'évolution virale. Pour ce faire, nous avons suivi durant une année, suite au diagnostic, d'infection par le VIH, 18 sujets de la cohorte de primo infection de Montréal, 9 ayant initié un traitement antirétroviral précocement alors que les 9 autres ont décidé de s'abstenir. Nous avons comparé la taille des réservoirs viraux au niveau des cellules mononuclées du sang périphérique chez les deux groupes de sujets et suivi l'évolution virale du gène *env* au niveau de la région C2V5 puisque cette partie du génome étant la plus variable, elle est plus susceptible d'être composée de diverses variantes virales tôt suivant l'infection. Les séquences virales ont été obtenues à partir du plasma, de l'ADN proviral ainsi qu'à partir d'une culture cellulaire ultrasensible de CD4+ activées à l'aide d'un anticorps bispécifique CD3,8. Cette technique permet de récupérer le virus capable de répliquer de populations cellulaires

Au cours de l'année, nous avons observé une diminution de la charge virale chez la majorité des patients peu importe le groupe. Pour les patients non traités, cette diminution correspond à l'action des réponses immunitaires partielles se produisant en début d'infection et à l'établissement de l'état d'équilibre entre le nombre de cellules nouvellement infectées versus le nombre de cellules détruites par les CTL ainsi qu'au nombre de virus neutralisés par les anticorps si présents. Chez les patients traités, la diminution est nettement plus marquée et tous les patients ont atteint une charge virale indétectable. Par contre, les taux de CD4 se sont améliorés chez les patients traités alors qu'ils se sont dégradés chez les non traités. Nous avons observé un déclin de la quantité de virus présent dans les réservoirs viraux, significativement plus important chez les patients traités que chez les non traités. Ces résultats démontrent l'effet positif du traitement sur le déclin des réservoirs. La réplication virale a diminué davantage chez les patients traités et seuls ces patients ont démontré une diminution du nombre d'IUPM. Ces premiers résultats semblent donc suggérer que les réservoirs seraient moins importants chez les patients ayant initié le traitement tôt suivant l'infection en contraste avec les patients n'ayant pas initié de traitement. Fort probablement que dans les prochaines années, un certain nombre de ces patients vont, eux aussi, initier un traitement antirétroviral et il serait fort intéressant de comparer une année plus tard la taille des réservoirs chez ces patients en comparaison avec les patients qui avaient choisi d'initier le traitement au tout début de l'infection. Le traitement semble donc diminuer la taille des réservoirs mais qu'en est-il au niveau de la diversité virale contenue dans ces réservoirs?

La réplication virale est responsable de l'apparition de la diversité virale, et plus celle-ci sera contrôlée rapidement moins les virus entrant dans les réservoirs auront eu le temps de se diversifier. Il existe un délai de plusieurs semaines suivant l'infection avant d'observer les premières réponses immunitaires. Durant cette période, les mutations observées au niveau viral seront issues de pressions de sélections négatives, c'est-à-dire que les variantes virales ainsi générés ne seront pas associés à des avantages évolutifs. Par contre, au fil de l'infection, et suite aux pressions de sélections provenant des CTL et des anticorps neutralisants, ces forces vont moduler la diversité virale. Les virus ayant des mutations associées à de l'échappement contre ces réponses seront favorisés et vont éventuellement émerger comme variantes dominantes. Le traitement va réduire la réplication dramatiquement et va donc ralentir l'évolution virale. Si le traitement est initié avec le début des premières réponses immunitaires, les virus qui auront été générés jusqu'à ce jour seront issus de pressions négatives. Ces virus devraient donc être majoritairement sensibles aux anti-rétroviraux, aux anticorps neutralisants ainsi qu'à l'action des CTL. Comme les réservoirs se mettent en place au début de l'infection, les réservoirs devraient également posséder ces mêmes caractéristiques. Chez les patients ayant débuté le traitement de façon précoce, les réservoirs viraux pourraient, en plus d'avoir une taille réduite, être constitués de virus sensibles et, de ce fait, nettement plus faciles à éradiquer que des virus ayant été exposés aux réponses immunitaires de l'hôte depuis de nombreuses années.

La seconde partie de notre étude porte donc sur la diversité virale retrouvée chez les patients en primo-infection ayant initié ou non un traitement antirétroviral. La diversité virale est un domaine d'étude complexe. D'abord, il existe une multitude de modèles mathématiques chacun ayant leurs points forts et leurs points faibles ainsi que leurs détracteurs. Bien que chaque modèle utilise une technique différente, tous les modèles devraient toutefois décrire les mêmes tendances dans une population donnée. Dans le cas du VIH, l'étude de la diversité est très complexe. D'abord parce que ce virus va muter rapidement de par les erreurs de sa transcriptase inverse mais aussi parce que les réponses immunitaires de l'hôte vont moduler son évolution. De plus, le choix du site de prélèvement va avoir un effet sur la diversité retrouvée (PBMC, plasma, sécrétion vaginales, liquide céphalo-rachidien, sperme, rate). Le choix du matériel génétique soit ARN viral, ARN plasmatique et ADN proviral ainsi que la méthodologie utilisée vont également avoir un effet sur la diversité retrouvée: culture cellulaire *in vitro* au préalable dans des cellules autologues ou non, PCR effectué sur une seule copie virale d'ARN ou ADN. Ultiment, la diversité virale est en fonction du temps post infection et la période choisie pour étudier la diversité va également avoir un effet sur la celle-ci.

Nous avons donc évalué la diversité virale de la région C2V5 chez les 18 sujets au moment le plus près de l'infection primaire à partir du virus plasmatique, de l'ADN proviral ainsi qu'à partir de virus récupérés à partir des cultures cellulaires. Nous avons alors observé une faible diversité virale chez tous les patients. Ces résultats sont en accord avec la littérature et plusieurs études ont démontré une diversité virale réduite lors de la transmission et tôt dans l'infection^{250, 327-329, 331-333, 354, 379}. Ces données suggèrent que lors

de la transmission, une variante est préférentiellement transmise et que ce serait à partir de ce virus fondateur que seront dérivées les quasi-espèces subséquentes.

Comme il ne s'agissait pas d'une étude randomisée, la décision d'initier ou non un traitement a pu être influencée par plusieurs facteurs comme une charge virale très élevée et/ou une diminution plus rapide des CD4. D'ailleurs, nous avons observé une charge virale plus élevée ainsi que des CD4+ plus faibles chez les patients qui allaient initier le traitement. Par contre, ces valeurs n'étaient pas statistiquement significatives.

Une année suivant le diagnostic, nous avons observé une augmentation de la diversité virale à l'intérieur des deux groupes, et ce, indépendamment de l'initiation ou de l'absence de traitement. L'augmentation de la diversité était plus importante chez les patients non traités particulièrement pour les régions hypervariables V4 et V5. Nous n'avons pas observé un plus grand nombre de sites de glycosylation. Peu de changement ont été observés dans la région de la boucle V3. Nous n'avons pas observé de changement d'acide en position 11 et/ou 25 ayant un impact sur la charge nette de la boucle V3. Des changements dans la charge de la boucle V3 vont modifier son affinité pour le récepteur CCR5 ou CXCR4 induisant potentiellement un changement de tropisme viral. Toutefois, puisque l'infection est généralement due à des virus de type R5 et que les virus X4, lorsque présents, n'émergent qu'en fin de progression, il n'est pas surprenant de constater que nos patients, dans un contexte de primo-infection, possèdent une relative homogénéité dans cette région. Il serait important de continuer le suivi de la charge de V3 afin de pouvoir surveiller un éventuel changement de tropisme. Par contre, la diversité ainsi que la complexité de la

boucle V4 est intéressante. Une étude récente a démontré la très grande variation de la boucle V4 principalement due à des insertions et délétions ayant un effet sur la position des PNG et possiblement sur la sensibilité aux Nabs²⁴⁸. Il demeure relativement difficile de recruter des patients dès le début de l'infection et un plus grand nombre de patients serait requis afin d'augmenter notre puissance statistique.. Toutefois, plusieurs d'études publiées portent également sur un nombre restreint de participants.

Shankarappa et al. ont observé chez 9 patients suivis pendant plus de 10 années une élévation de la diversité de la région C2V5 d'environ 1% par an jusqu'à un plateau d'environ 5% puis finalement, une phase de déclin de la diversité virale²⁵⁰. Pour notre part, nous avons observé une élévation de +0.10% de la diversité de la région C2V5 durant la première année post-infection ce qui est considérablement inférieur aux résultats de Shankarappa et al. Les patients de cette étude ont été infectés entre 1983 et 1984 et étaient infectés depuis moins de 8 mois. Les patients choisis avaient aussi un faible taux de CD4+ et tous présentaient des signes de progression, ce qui suggère que ces patients n'étaient pas réellement en primo-infection. Il est probable qu'à l'époque, les tests de dépistage du VIH étant moins sensibles qu'aujourd'hui, ces patients étaient déjà dans la phase chronique de l'infection virale et présentaient déjà une diversité virale plus importante. Encore aujourd'hui, l'infection étant souvent asymptomatique, il n'est pas aisé de recruter des patients lors de la primo-infection. Par contre, grâce aux efforts d'information des cliniciens de la cohorte de Primo-Infection de Montréal, il nous est permis d'accéder à des prélèvements sanguins au tout début de l'infection. En 2006, l'équipe du Dr. Mullins a analysé la variabilité génétique de divers patients provenant de

différentes cohortes et, bien qu'il ne remet pas en doute l'augmentation de la divergence de 1% par an, il ajoute qu'il existe un délai d'environ 2-3 ans chez une grande proportion de patients avant de voir apparaître cette divergence annuelle de 1% ³⁸⁰. Par contre, nos résultats pour les régions hypervariables V3, V4 et V5 des patients non traités sont près de 1% avec 0,75%, 0,73% et 0,77% respectivement. Toutefois, étant donné la petite taille de ces régions, particulièrement pour V5, une seule mutation représente un pourcentage important.

Dernièrement, le Dr. Siliciano et son équipe ont proposé une nouvelle théorie affirmant que chez les patients ayant une réponse optimale à la thérapie antirétrovirale, il n'y a plus de réplication virale et donc l'évolution virale est stoppée (CROI 2009). Selon cette équipe, l'observation d'évolution virale durant le traitement serait due à un traitement non-adéquat permettant un faible niveau de réplication. À la lumière de nos résultats, cette théorie ne semble pas s'appliquer à nos patients puisque nous avons observé une évolution virale au cours de la première année de traitement bien que celle-ci soit faible et inférieure à l'évolution décrite par Shankarappa. Nos résultats suggèrent qu'il se produit bel et bien de la réplication à faible niveau chez les patients traités. Par contre, chez certains patients, nous avons observé une diminution ou une stagnation de la diversité. C'est le cas chez 4 patients traités ainsi que chez un patient non traité qui semblait très bien contrôler son infection en maintenant des CD4 supérieurs à 900 ainsi qu'une charge virale inférieure à 1000 copies d'ARN/ml, suggérant que ce patient pourrait potentiellement devenir un contrôleur élite. Il reste donc cinq patients traités chez qui nous avons observé une évolution virale. Si la théorie selon laquelle toute évolution virale est impossible sous

traitement optimal, nous devrions conclure que plus de la moitié des participants ne recevait pas un traitement optimal ou n'y ont pas bien adhéré. Par contre, nous n'avons pas d'indication en ce sens, ces patients ont tous atteints une charge virale indétectable ainsi qu'une amélioration importante de leur décompte CD4. Il est fort probable que des virus se soient intégrés dans des cellules mémoires possédant des spécificités contre des micro-organismes usuels et que, de façon ponctuelle, ces cellules soient réactivées et relarguent du virus. Ce phénomène pourrait expliquer la présence d'évolution virale chez les patients traités.

Bien que la majorité des études sur la diversité ait démontré une population virale homogène en primo-infection, plusieurs études ont obtenu des résultats contradictoires quant au degré de cette divergence au fil du temps ainsi que sur son rôle dans la progression de la maladie. Une question demeure entière : est-ce que la présence d'une population virale homogène est le résultat de la transmission d'une seule variante de laquelle vont découler toutes les variantes futures? Ou est-ce qu'une multitude de variantes seraient transmises et que, suite à un processus d'homogénéisation à l'intérieur de l'hôte nouvellement infecté, une seule variante émergerait et coloniserait son hôte? Afin de répondre à cette question avec une certaine puissance statistique, il faudrait avoir accès à un très grand nombre de spécimens provenant de patients récemment infectés. Puisque l'infection par le VIH est souvent asymptomatique ou semblable à d'autres infections plutôt banales, les patients n'ont pas tendance à consulter durant cette période. De plus, il est souvent complexe d'évaluer avec exactitude la date de l'infection et les critères de l'infection primaire diffèrent selon les cohortes. Toutefois, plusieurs études indépendantes,

[Type text]

incluant la nôtre, ayant des critères de sélection distincts, des modes de transmission différents ou effectuées sur des divers sous-types sont parvenues à une même conclusion. En effet, il ressort que la diversité virale est très limitée dans le gène de l'enveloppe, plus précisément dans la région C2V5 dans les tous premiers stages de l'infection. Publiée en novembre 2008, l'étude de Keele et coll. effectuée sur des patients infectés depuis moins de 30 jours a permis de conclure que la majorité des patients étaient infectés avec un seul variant, le virus fondateur, alors que chez quelques patients, on retrouve plutôt une infection polyclonale c'est-à-dire avec plus d'un virus fondateur⁹⁸. Il s'agit d'une percée importante puisqu'une population homogène devrait être plus facile à éradiquer qu'une population très diversifiée. La primo-infection serait donc une excellente occasion d'agir thérapeutiquement soit avec des médicaments puissants ou avec un vaccin fabriqué à partir d'épitopes très conservés chez une majorité d'isolats. Par contre, une question persiste toujours, est-ce que le mode de transmission joue un rôle dans le nombre de variantes transmis? Pour répondre à cette question, nous participons présentement à une étude à partir de spécimens provenant de patients infectés par utilisation de drogue intraveineuse afin d'évaluer si ce mode de transmission serait associé à un risque plus élevé de se voir transmettre de multiples variantes.

Une autre problématique reliée à l'étude de la diversité est le choix du matériel génétique étudié : soit ARN plasmatique, ADN proviral et ARN provenant de culture cellulaire. L'ARN plasmatique est représentatif du virus se répliquant présentement chez un individu donc de virus le mieux adapté à son environnement. Dans le plasma, la diversité virale est faible alors que la divergence avec le virus fondateur va augmenter avec le temps. L'ARN

plasmatique nous renseigne donc sur le virus se répliquant présentement ou venant d'être relargué des réservoirs mais ne donne aucune information sur les virus qui ont déjà été présents. Il est également possible d'évaluer la diversité génétique à l'aide de l'ADN proviral. Contrairement à l'ARN plasmatique, l'ADN proviral est intégré à la cellule et celui-ci, peut ne pas être fonctionnel. En fait, lors de l'intégration, plusieurs virus vont s'intégrer de façon déficiente dans le génome cellulaire. La diversité sera alors surestimée puisque plusieurs variantes recensées seront, en fait, des culs-de-sac réplikatifs et n'auront pas d'influence sur le cours de l'infection. On peut y retrouver en plus des variantes contemporaines, toutes les variantes ayant déjà été présentes chez un individu et, de ce fait, l'ADN proviral nous permet d'évaluer la diversité contenue dans les réservoirs viraux. Par conséquent, certaines variantes archivées seront très proches du virus fondateur alors que les variantes contemporaines en seront beaucoup plus éloignées. Chez les patients répondant bien aux traitements et dont la charge virale est indétectable ainsi que chez les nouveaux-nés, l'analyse à partir de l'ADN proviral est souvent la seule façon de détecter le virus.

Finalement, une autre façon d'obtenir de l'information sur les variantes présentes chez un individu consiste à mettre en culture les cellules du patient et, après quelques jours d'incubation, d'en récolter l'ARN viral à partir des surnageants. Cette technique présente plusieurs avantages. D'abord puisque le matériel de départ consiste de cellules, les variantes virales vont représenter autant les variantes archivées que les variantes contemporaines. De plus, seul des virus aptes à se répliquer seront présents dans le surnageant. La culture cellulaire nous libère donc de la possibilité d'identifier des variantes

[Type text]

défectueuses. Par contre, la culture cellulaire ne représente pas l'environnement auquel fait face le virus chez son hôte et il est possible que des mutations se produisent durant la culture cellulaire et pourraient permettre l'identification de variantes qui ne sont pas présentes chez l'hôte. Quoique minime, ce risque est réel et il est important de travailler avec des cellules autologues.

Dans notre étude, nous avons évalué la diversité virale à partir de l'ARN plasmatique, de l'ADN proviral dilué en série ainsi qu'à partir des surnageant de culture. Bien que le nombre de séquences obtenu soit relativement faible, nous n'avons pas observé de différences de diversité marquée selon la provenance du matériel génétique. De plus, les séquences intra-patients étaient fortement reliées. L'utilisation de divers matériel génétique, l'indépendance des expériences ainsi que l'absence de contamination inter-patients tout au long de notre étude, semblent confirmer que nos résultats reflètent bien la réalité d'une faible diversité lors de la primo-infection et ne sont pas dus à des erreurs techniques.

En plus de la problématique reliée au matériel génétique choisi, il existe également plusieurs problématiques au niveau technique. L'objectif étant d'identifier toutes les quasi-espèces présentes à l'intérieur d'un spécimen il est nécessaire de développer des outils permettant l'identification des variantes virales majoritaires autant que des variantes-espèces minoritaires. Une façon d'identifier un maximum de variantes consiste à cloner le produit PCR dans un plasmide puis, suite à la transformation bactérienne, séquencer toutes les colonies présentes sur la gélose. Cette technique, bien que facile d'approche, est de

moins en moins utilisée puisqu'elle requiert l'isolation de centaines de colonies afin d'identifier un maximum de variantes. La technique la plus utilisée présentement consiste à effectuer à partir de l'ARN ou l'ADN des dilutions en série puis de séquencer la plus faible dilution permettant d'obtenir un résultat positif suite au PCR. Le principe de cette technique repose sur le séquençage d'une seule particule virale par réaction de PCR (Single Genome Sequencing) et, bien qu'elle permette d'identifier un maximum de quasi-espèces, nécessite la réalisation de centaines de réactions de PCR en plus d'être laborieuse. Le risque de contamination inter-patients est également important. De plus, il est primordial d'utiliser des enzymes très performantes à très haute fidélité puisqu'une erreur introduite lors du premier cycle sera répétée à chacun des cycles subséquents. Également, bien que l'objectif est d'effectuer la réaction de PCR sur une seule copie de génome viral, dans la réalité il est fréquent d'avoir plutôt deux ou trois copies par réaction ce qui rend l'analyse des chromatogrammes impossible. Pour notre étude, nous avons effectué le clonage de produits de PCR provenant des surnageants de la culture cellulaire et nous avons effectué des dilutions en série sur l'ADN proviral.

En 2005, une nouvelle technique, le Ultra Deep Sequencing ou 454, permet le séquençage à haut débit. Cette technique est semblable au PCR en temps réel mais appliquée au domaine du séquençage puisque la fluorescence émise lors l'ajout d'un nucléotide est captée en temps réel³⁸¹. Cette technique permet de séquencer plus de 400 millions de paires de bases en quelques heures. Elle est extrêmement sensible et permet d'identifier tous les polymorphismes présents dans un échantillon, et ce, même s'ils y sont très peu représentés.

Le ultra deep sequencing va certainement devenir un outil très important dans l'étude de la diversité virale chez les patients VIH.

Depuis quelques mois, nous avons accès via Génome Québec à la technologie Ultra Deep Sequencing. Nous pourrions donc confirmer nos résultats et, dans nos projets futurs, utiliser directement cette technique de pointe.

Notre étude a donc démontré la présence de réservoirs viraux de plus petite taille chez les patients ayant initié un traitement antirétroviral ainsi qu'une diminution de leur charge virale et une amélioration de leur CD4+. Nous avons également observé la présence d'une population virale homogène dans les premiers stades de l'infection. Il pourrait donc s'agir d'un moment propice pour agir et introduire un traitement antirétroviral puissant afin d'avoir un effet maximal et possiblement de parvenir à l'éradication virale. Notre étude a également démontré la présence d'une évolution virale chez les patients non traités et, dans une moindre mesure, chez les patients traités suggérant la présence de réplication à faible niveau chez les patients traités. La présence de la diversité virale chez un hôte ainsi que la persistance virale sont deux phénomènes importants et impliqués dans la difficulté de traiter et d'éradiquer l'infection par le VIH. Il serait intéressant de poursuivre notre étude sur ces patients pendant plusieurs années afin de suivre l'évolution de la diversité virale en fonction de leur progression. En continuant le suivi, il serait primordial de documenter la nature des mutations qui vont apparaître. Est-ce que ces mutations seront issues de pressions de sélection positive telles : mutations de résistance aux ARV, d'échappement aux Nabs ou aux CTL, changement de tropisme, diminution/augmentation de la capacité

répliquative. Aussi, le suivi pourrait permettre d'améliorer nos connaissances sur l'évolution virale dans un contexte de traitement précoce à savoir si ces patients vont conserver une diversité réduite par rapport aux patients non traités ou si éventuellement leur niveau de diversité va atteindre le même niveau que chez les non traités. Également, nous pourrions analyser l'évolution virale dans d'autres régions du génome afin de vérifier si nos résultats sont uniques à la région C2V5 ou s'ils sont reproduits dans la totalité du génome. En effet, il est possible que des mutations dans le gène *pol* soient plus nombreuses chez les patients traités que chez les patients non traités. Il est également possible que la diversité soit différente selon la population cellulaire ou le site de prélèvement et il s'agit d'une avenue intéressante à développer. Idéalement, il faudrait suivre un plus grand nombre de patients nouvellement infectés afin d'augmenter la puissance statistique de notre étude. En conclusion, bien que notre étude suggère que le traitement précoce procurerait un bénéfice, il reste beaucoup à découvrir dans l'étude de la diversité virale et de nombreuses années de recherche seront encore nécessaires afin de bien comprendre la dynamique de la diversité virale ainsi que les forces et les facteurs en jeu.

En plus de la diversité à l'intérieur d'un hôte, il existe une diversité inter-hôte. Celle-ci est caractérisée par la diversité entre les virus d'un même sous-type ainsi que celle attribuée aux différents sous-types. Le VIH démontre une variabilité extrême et cette variabilité n'est pas sans conséquences diagnostiques et thérapeutiques^{205, 382}. Tous ces différents virus n'ont pas la même sensibilité aux ARV et n'ont pas le même pouvoir pathogène. Puisque la diversité des acides aminés du gène *pol* varie d'environ 10 à 15% entre les sous-types, un seul changement dans la séquence des acides aminés peut donc altérer

[Type text]

drastiquement la sensibilité d'un virus à un médicament antirétroviral. Dans la seconde partie de notre étude, nous avons voulu évaluer l'impact de la diversité virale chez une population infectée avec des sous-types non-B sur l'efficacité du traitement antirétroviral ainsi que la présence de mutations associées à de la résistance aux ARV. La majorité des connaissances sur les traitements et la diversité virale sont basées sur les virus de sous-type B alors que ce sous-type est sous-représenté sur le continent Africain. Depuis quelques années, beaucoup d'efforts sont déployés pour améliorer l'accès aux traitements dans les régions les plus touchées par l'épidémie de VIH/SIDA. Il est donc essentiel d'améliorer nos connaissances sur la diversité génétique des sous-types non-B et sur leur profil thérapeutique puisque que l'apparition de diversité, associée à des mutations de résistance, sont des facteurs majeurs de l'échec thérapeutique.

Nous avons évalué chez 101 patients du Mali, le degré de diversité virale ainsi que la présence de résistance primaire chez des patients n'ayant jamais été exposés à des traitements ARV. En premier lieu, nous avons observé une variation génétique importante dans cette région. Nous avons retrouvé le sous-type CRF02_AG à une fréquence de 71% suivi du sous-type CRF06_cpx à près de 8%. Nous avons également observé la présence des sous-types B, C, G, AE, A, AD ainsi que CRF09_cpx et CRF013_cpx. Nos études génotypiques nous ont permis d'observer un taux de 29% des mutations de résistance aux antirétroviraux. De ces mutations, 5% étaient associées à de la résistance aux INTI, la plus représentée étant la mutation T215A/Y, suivie de M41L, D67N, M184V, L210W et K219E. Nous avons également observé un taux de 6% de mutations de résistance associées aux INNTI avec la mutation K103N présente chez 3 patients suivi de V108I, V179E et

Y181C. Finalement, nous avons également observé la présence de la mutation L10I/V chez plus de 20% des patients. Cette mutation présente chez environ 5 à 10% des patients non traités est associée à de la résistance aux IP lorsque présente avec d'autres mutations. Toutefois le rôle de ce polymorphisme sur la résistance aux inhibiteurs de la protéase n'est pas clair et des études de mutagenèse dirigée sont présentement en cours dans notre laboratoire afin d'observer l'effet de cette mutation sur la concentration minimale inhibitrice des inhibiteurs de la protéase.

La diversité virale semble augmenter dans cette région avec une diminution de la prévalence du sous-type CRF02_AG et une augmentation de certains sous-types préalablement inexistant dans la région. Cette augmentation de la diversité pourrait avoir une implication sur le taux de succès des thérapies antirétrovirales. Si nous excluons la mutation L10I/V de notre analyse, nous obtenons alors un taux de résistance primaire de 10%. Il existe plusieurs études sur la prévalence de mutations de résistance au Mali depuis les années 2000. D'abord en 2002, Derache et al. ont rapporté un taux de 0% de résistance primaire ³⁸³. Cette même équipe a rapporté des taux de 3% en 2005 et de 11.5% en 2006 ³⁸⁴ et ce, en tenant compte de la mutation L10I/V. Des analyses de la prévalence de résistance primaire conduites en Ouganda, au Rwanda, en Mozambique et en Zambie indiquent que la prévalence de la résistance est pratiquement inexistante dans ces régions ³⁸⁵. Aussi, une étude de surveillance au Nigeria n'a observé aucune résistance primaire ³⁸⁶. Toutefois une prévalence de 3.5% a été notée en Tanzanie ³⁸⁷, de 4.3% au Congo ³⁸⁸ et de 5.6% en Côte-d'Ivoire ³⁸⁹. Les résultats obtenus par notre étude sont donc nettement supérieurs. Toutefois, les ARV sont disponibles depuis 1997 et sont distribués

[Type text]

gratuitement depuis 2004 au Mali. La population est donc exposée aux ARV depuis presque la même période de temps que les patients des pays développés où des taux de 7 à 20% de résistance primaire ont été observés³⁹⁰⁻³⁹³. Nos résultats suggèrent que les pays en voie de développement ayant de plus en plus accès aux traitements antirétroviraux devront, tout comme les pays développés, faire face aux défis occasionnés par les échecs thérapeutiques dus à la présence de virus transmis possédant des mutations de résistance. De plus, nous avons observé de la résistance multiple chez quatre patients conférant de la résistance à la presque totalité des INNTI.

À la lumière de nos résultats, il est donc essentiel de prendre action dès aujourd'hui afin d'éviter une catastrophe potentielle. Plusieurs niveaux d'interventions sont importants, allant de la formation des dispensateurs d'antirétroviraux, aux programmes d'adhérence, aux mesures administratives pour assurer la continuité dans l'approvisionnement des ARV et à l'augmentation de l'accessibilité d'outils diagnostiques comme la charge virale. Il sera également important de suivre à l'échelle des populations la résistance primaire au fil du temps.

Par la suite, nous avons effectué le suivi de 801 patients provenant du Mali ainsi que du Burkina Faso s'appêtant à débiter le traitement antirétroviral. Nos résultats ont démontré que les patients infectés par des sous-types non-B, répondent très bien au traitement, et ce, malgré la diversité génétique importante dans ces régions. En effet, 75% des patients traités avaient une charge virale indétectable à la visite de suivi soit 6 mois après le début du traitement. Chez les 113 patients n'ayant pas atteint une charge virale indétectable après

six mois, 77 ont été rencontrés afin de leur souligner l'importance de l'adhérence au traitement. De ces 77 patients rencontrés, 13 ont finalement atteint une charge virale en-dessous du seuil de détection, augmentant ici le pourcentage total de patients ayant bien répondu au traitement à près de 76%. Plusieurs études ont obtenu une suppression virale à des niveaux similaires^{394, 395}. Par contre, chez les patients ayant des charges virales détectables persistantes, les risques d'apparition de résistance sont élevés³⁹⁶. Nous avons donc effectué le génotypage des patients en échec thérapeutique. D'abord au niveau des sous-types représentés, nous avons observé le sous-type CRF02_AG chez 68% des cas, le sous-type CRF06_cpx à 7% ainsi que les sous-types CRF01_AE, AK, K, C, GH et B chez 3.6% des patients respectivement. Ces résultats sont similaires bien que légèrement inférieurs aux fréquences obtenues dans la base de données de l'organisme Los Alamos alors que 70% des séquences appartiennent au sous-type CRF02_AG et 12% au sous-type CRF06_cpx. Il semble y avoir une diminution de la fréquence de ce sous-type au Mali. En effet, ce sous-type représentait 88% des cas d'infection par le VIH en 2002³⁸³. Une autre étude a obtenu un taux de 72% en 2005-2006³⁸⁴. Pour le Burkina Faso, 44% des patients étaient plutôt infectés avec un virus de clade CRF06_cpx et 39% avec le sous-type CRF_02_AG. Ces résultats étant légèrement différents de ceux obtenus par Nadembega, W M et all. en 2006 qui ont retrouvé 55% de virus de sous-type CRF06_cpx et 33% de CFR02_AG³⁹⁷. Nous avons également retrouvé les sous-types AGG, AA et B à 5.6% chacun. Dans la base de données de Los Alamos on retrouve pour le Burkina Faso, le sous-type CRF06_cpx à 51% suivi du sous-type CRF02_AG à 37%. Il est donc fort intéressant de constater que le virus du VIH est très diversifié dans cette région et que, malgré tout, les patients répondent bien aux traitements. Bien que ce ne fut pas le but de notre étude, il sera

intéressant d'évaluer la fréquence des sous-types des patients ayant bien répondu aux traitements afin d'observer si certains sous-types sont sur ou sous-représentés chez les patients ayant échoué. Toutefois, les fréquences observées par sous-type sont similaires aux résultats des bases de données, ce qui nous permet de supposer que l'échec n'est pas ou très faiblement relié au sous-type.

Nous avons ensuite évalué la présence de mutation de résistances chez les patients en échec thérapeutique. Chez les patients traités avec des INTI tel l'AZT en combinaison avec 3TC ou D4T, la mutation M184V/I lors d'échec thérapeutique va apparaître et si le traitement non-suppressif est maintenu, d'autres mutations associées au TAM (thymidine-analogue-associated mutations) vont éventuellement émerger ³⁹⁸. Deux voies de résistances distinctes ont été décrites, d'abord les TAM1 (M41L, L210W, T215Y) ou TAM2 (D67N, K70R, T215F, K219Q/E ^{399, 400}. Toutefois, ces études sur la résistance ont été effectuées à partir d'observations chez des patients infectés par des virus du sous-type B. Dans notre étude, 83% des patients possédaient la mutation M184V/I qui est fortement associée à la résistance au 3TC, au FTC et dans une moindre mesure à ABC. De plus, 52% des patients avaient des mutations associées aux TAM. Un fait intéressant dans notre étude, les virus de sous-type AGK/AK/K possédant des mutations de résistance étaient plus fréquemment associés au TAM2, ce qui pourrait suggérer que ce sous-type évolue préférentiellement vers les TAM2.

Pour les INNTI, la mutation K103N était la plus commune, suivie des mutations Y181C, P225H, G190A/S et K101E. La mutation K103 était statistiquement plus fréquente chez le sous-type AG que chez les AGK (69% versus 33%, $p = 0,042$). Toutefois, un plus grand nombre de ces patients infectés avec le sous-type CRFAG_02 étaient traités avec EFV. Aussi, la mutation K101E a été observée avec une plus grande fréquence chez le sous-type CRF06_cpx (25% versus 0%). La présence de la mutation K103N est inquiétante puisqu'elle est associée à de la résistance à la NVP et cet antirétroviral est administré sous forme de dose unique afin de prévenir la transmission mère-enfant. Plus, de 500 000 enfants sont infectés chaque année dont 90% provenant de la transmission de la mère à l'enfant. Depuis le début des années 2000, l'OMS endosse l'administration des doses uniques de NVP administrées aux femmes sur le point d'accoucher ainsi que chez le nouveau-né afin de minimiser les risques de transmission⁴⁰¹⁻⁴⁰³.

Onze patients ont reçu un traitement comprenant un inhibiteur de la protéase. Nous avons observé la présence de mutations chez quatre d'entre eux (G48W, I54V, V82A/T) ainsi que plusieurs polymorphismes tels : K20I, M36I et L10V/M/I.

Finalement, nous avons vérifié si la présence de résistance chez nos patients était due à la transmission de virus résistants ou si ces mutations de résistance se sont produites *de novo* chez les patients initiant un traitement antirétroviral. La première étape de notre analyse fut d'abord d'évaluer si notre population était indépendante des autres séquences AG et AGK déjà décrites. À l'aide des séquences disponibles dans la base de données de Los Alamos, nous avons généré une multitude d'arbres phylogénétiques avec la méthode de parcimonie

maximale. L'objectif est de créer l'arbre le plus parcimonieux, c'est-à-dire l'arbre représentant la disposition des séquences nécessitant le moins de changement possible. Cette analyse a permis de conclure qu'il y a échange génétique entre nos séquences et les séquences obtenues à partir de la base de données et donc nos séquences ne sont pas monolithiques et sont distribuées sur diverses branches de l'arbre. Néanmoins, nos séquences sont plus isolées entre elles et sont distinctes des autres séquences AG et AGK décrites. L'arbre phylogénétique de la figure 1 représente bien ce phénomène puisque plusieurs séquences sont sur les mêmes branches de l'arbre. Ce résultat n'est pas surprenant puisque des virus locaux vont souvent démontrer une forte homologie. C'est le cas d'ailleurs des virus retrouvés chez les patients de la cohorte de primo infection de Montréal où les virus retrouvés sont plus près les uns des autres que des virus de sous-type provenant d'une autre région géographique. Or les séquences du Mali et du Burkina Faso sont plus près les unes des autres que des autres séquences AG et AGK décrites dans la banque de données.

Cette analyse a démontré que la population virale étudiée est distincte et évolue de façon indépendante des autres virus CRF02_AG et CRF06_cpx. Nous nous sommes ensuite posé la question à savoir, puisque ces virus sont fortement reliés, est-ce que les mutations observées étaient présentes chez l'ancêtre commun ou si ces mutations se sont plutôt produites *de novo* chez ces individus. Nous avons donc calculé le nombre de mutations requises pour changer le génotype de virus sensible à virus résistant. Si les mutations de résistances sont transmises, nous nous attendons donc à observer un faible nombre de mutations et nous devrions observer ces mutations à la base de la branche principale

représentant des mutations s'étant produites tôt dans l'évolution virale de notre population. Nous avons observé 57 changements requis pour expliquer toutes les mutations de résistance observées dans notre population de virus AG et 17 pour les AGK. Ces valeurs sont beaucoup trop élevées pour supporter la thèse selon laquelle un ancêtre commun résistant était présent et a été transmis dans notre population et donc, les mutations observées se sont produites *de novo* chez ces individus. Seule la mutation M184V atteint les seuils de signification et nous pourrions conclure que cette mutation est bel et bien transmise dans la population. Mais l'explication alternative serait la facilité de sélection de cette mutation en présence d'un traitement sous-optimal contenant la 3TC.

Cette étude effectuée au Mali et au Burkina Faso nous renseigne sur l'impact de la diversité virale sur le traitement et nos résultats démontrent que celle-ci n'est pas un obstacle majeur lors de l'initiation de la thérapie chez les patients infectés avec des sous-types non-B. Bien que nous ayons observé un certain nombre d'échecs thérapeutiques et que les séquences de virus sont relativement homologues et près les unes des autres, les mutations se sont produites *de novo* chez les patients et ne sont pas associées à un ancêtre commun résistant ayant été le point de départ de l'infection dans ces communautés.

Ces résultats sont intéressants et nous renseignent sur la diversité virale de ces régions ainsi que sur les effets de l'initiation du traitement sur des sous-types non-B. D'abord, nos résultats démontrent que plus de 75% des patients traités ont très bien répondu aux traitements ce qui est en accord avec la littérature⁴⁰⁴. Ces résultats sont très encourageants à plusieurs niveaux. Premièrement, les antirétroviraux semblent avoir un excellent effet

[Type text]

antiviral chez les sous-types non-B à des niveaux similaires au sous-type B. D'autant plus que les patients enrôlés dans notre étude étaient à des stades relativement avancés de l'infection, comme l'indique le décompte des CD4 qui est inférieur à 200 cell/mm³ pour la majorité des patients, ces résultats sont très encourageants. Nos résultats confirment l'importance et l'impact majeur de l'initiation du traitement sur la pandémie d'infection par le VIH dans les régions les plus touchées. En plus d'améliorer significativement la qualité de vie des personnes atteintes, c'est toute l'économie de certains pays qui devrait en profiter. De plus, l'initiation du traitement devrait diminuer l'incidence dans les années à venir. De ce fait, tous les efforts visant à améliorer l'accès gratuitement ou à peu de frais aux traitements devraient être maintenus et rendus disponibles à plus grande échelle. Toutefois, il est également essentiel de continuer le suivi de l'évolution des mutations de résistance des sous-types non-B afin de bien documenter les voies de résistances. Il y a fort à parier que les pays en développement seront, dans un avenir rapproché, confrontés aux mêmes problèmes liés à la résistance aux antirétroviraux que les pays développés. Il est donc primordial de mettre sur pied des infrastructures médicales solides permettant le suivi des patients possédant des virus résistants à certains antirétroviraux et que les efforts fournis pour améliorer l'accès aux ARV ne soient pas suivis d'un vide pharmaceutique important lorsque les problèmes liés à la résistance vont émerger. Il faudra développer l'accès aux nouvelles classes de médicaments, et ce, rapidement et à des coûts acceptables pour ces populations.

4. Conclusion

Les perspectives de notre travail sont diverses. D'abord l'étude de la diversité virale chez les patients de la cohorte de primo-infection de Montréal a démontré une population virale homogène au début de l'infection, suivi par une augmentation de la diversité virale en fonction du temps. Bien que non statistiquement significative, cette augmentation était plus importante chez les patients n'ayant pas initié de traitement. L'initiation précoce du traitement suite à l'infection pourrait avoir comme effet de limiter la taille ainsi que le nombre de sous-espèces alimentant les réservoirs. De ce fait, un traitement agressif lors de la primo-infection pourrait permettre l'éradication du virus. De plus, la présence d'une population virale homogène au tout début de l'infection pourrait représenter un moment propice au développement de vaccins.

De plus, malgré une diversité génétique importante de la région sub-saharienne, notre travail a démontré que plus de 75% des patients infectés avec des sous-types non-B réagissaient bien au traitement et atteignaient des niveaux de charge virale indétectable. Notre étude a aussi confirmé la proximité des virus présents dans cette région tout en confirmant que la majorité des mutations de résistance étaient produites *de novo* chez ces patients. Notre travail souligne bien l'efficacité des programmes d'accès aux antirétroviraux dans les régions les plus pauvres et les plus touchées par l'épidémie du VIH.

5. Annexe I- Article supplémentaire

J Acquir Immune Defic Syndr • Volume 48, Number 4, August 1, 2008

EPIDEMIOLOGY AND SOCIAL SCIENCE

Low Prevalence of Detectable HIV Plasma Viremia in Patients Treated With Antiretroviral Therapy in Burkina Faso and Mali

Catherine Boileau, PhD, * Vinh-Kim Nguyen, MD, PhD,† Mohamed Sylla, MSc,‡ Nima Machouf, PhD, § Annie Chamberland, PhD, ‡ Hamar A. Traoré, MD, || Pascal A. Niamba, MD, PhD, Ismaël Diallo, MD,# Moussa Maïga, MD,** Mamadou Cissé, MD,†† Sélim Rashed, MD, PhD,‡‡ and Cécile Tremblay, MD, PhD‡

Received for publication January 3, 2008; accepted April 24, 2008. From the *Institute for Health and Social Policy–McGill University, Montreal, Quebec, Canada; †Département de Médecine Sociale et Préventive–Université de Montréal, Montreal, Canada; ‡Département de Microbiologie et Immunologie–Université de Montréal, Montreal, Canada; §Clinique Médicale L’Actuel, Montréal, Quebec, Canada; || Hôpital National du Point G–Unité de Médecine Interne, Bamako, Mali; {Centre Universitaire Hospitalier Yalgado-Ouédraogo–Unité de Dermatologie, Ouagadougou, Burkina Faso; #Centre Universitaire Hospitalier Yalgado-Ouédraogo–Unité de Médecine Interne, Ouagadougou, Burkina Faso; **Hôpital Gabriel Touré, Bamako, Mali; ††Centre de soins, d’animation et de conseils pour les personnes atteintes du VIH/SIDA (CESAC), Bamako, Mali; and ‡‡Unité de Santé Internationale–Université de Montréal, Montreal, Canada. Supported by the Canadian

Institute of Health Research (Canadian Institute for Health Research-Recherche in Institut de Recherche en Santé du Canada).

Presented at the XVI International AIDS conference, August 13–18, 2006, Toronto.

Correspondence to: Catherine Boileau, PhD, Institute for Health and Social Policy–McGill University, 1130 Pine Avenue West, Montréal, Québec, Canada H3A 1A3

Copyright _ 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

[Type text]

Abstract

Background: Sub-Saharan Africa has seen dramatic increases in the numbers of people treated with antiretroviral therapy (ART). Although standard ART regimens are now universally applied, viral load measurement is not currently part of standard monitoring protocols in sub-Saharan Africa.

Methods: We describe the prevalence of inadequate virological response (IVR) to ART (viral load ≥ 500 copies/mL) and identify factors associated with this outcome in 606 HIV-positive patients treated for at least 6 months. Recruitment took place in 7 hospitals and community-based sites in Bamako and Ouagadougou, and information was collected using medical charts and interviews.

Results: The overall prevalence of IVR in treatment-naive patients was 12.3% and 24.4% for pretreated patients. There were no differences in rates of IVR according to ART delivery sites and time on treatment. Patients living farther away [odds ratio (OR) = 2.48; 95% confidence interval (CI) 1.40 to 4.39], those on protease inhibitor or nucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens (OR = 3.23; 95% CI 1.79 to 5.82) and those reporting treatment interruptions (OR = 2.36; 95% CI 1.35 to 4.15), had increased odds of IVR. Immune suppression (OR = 3.32, 95% CI 1.94 to 5.70) and poor self-rated health (OR = 2.00; 95% CI 1.17 to 3.41) were also associated with IVR.

Conclusions: Sufficient expertise and dedication exist in public hospital and community-based programs to achieve rates of treatment success comparable to better-resourced settings.

KeyWords:

Viral load, antiretroviral treatment monitoring, sub-Saharan Africa, immune suppression,
public hospital, community-based organization

(J Acquir Immune Defic Syndr 2008;48:476–484)

Background

Sub-Saharan Africa has seen dramatic increases in the numbers of people treated with antiretroviral therapy (ART). ART is now considered an integral part of the comprehensive response to HIV prevention, care, and support.¹ Highly active antiretroviral therapy (HAART) requires that patients take at least 3 different antiretrovirals (ARVs) daily for life. Factors that are predictors of response to ART include adherence,²⁻⁴ stage of disease with immune status at baseline,^{5,6} treatment history,^{7,8} and sociodemographic factors such as age and gender.⁹ But, by far, the most important determinant of therapeutic success is adherence to treatment. HIV infection has management requirements that are especially difficult to meet in sub-Saharan countries where resources are scarce, such as long-term follow-up and support of patients and frequent laboratory monitoring. Despite considerable challenges, ART treatment programs in resource-poor settings have success rates similar to those reported for developed countries despite low standards of monitoring.¹⁰ Early results from Senegal and Cote d'Ivoire,¹¹⁻¹³ Uganda,^{14,15} and from South Africa¹⁶ were particularly encouraging. These studies show remarkably high rates of adherence and excellent virological and immunological outcomes, allaying initial concerns about difficulties with adherence and inadequate infrastructure. Less commented upon, however, has been the fact that these initial pilot projects were better resourced than what can be expected in more routine settings. As demonstration projects, many received technical assistance by expatriate physicians, had selected for the most motivated patients, and had direct links to academic resources in the North. However, as treatment access is expanded and

decentralized, it will be difficult to maintain this intensity of resources, follow-up, and motivation. Moreover, free ARVs do not release the patient from the burden of additional expenditures. Laboratory monitoring may not be free, and even if it is, patients must often incur transportation costs to travel to appointments and often find that their food expenditures increase with improved health and appetite. This has been cited as a potential barrier to adherence.¹⁷ Standard HAART comprises 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) for first-line therapy and a protease inhibitor (PI)-based regimen for second-line treatment.¹ Although these regimens are now universally applied, standards for laboratory monitoring of patients greatly depend on availability of basic laboratory services and appropriate training and quality control. These continue to be limited, and many regions in developing countries still rely on clinical status alone for treatment decisions. CD4 cell count remains the strongest predictor of HIV-related complications¹⁸ and is widely advocated by World Health Organization (WHO) for treatment initiation and monitoring. Viral load (VL) measurements¹ and drug resistance surveillance¹⁹ are not recommended for wide use in public health management of ART and remain restricted because of cost. Nonetheless, a growing number of urban centers are equipped with facilities able to perform VL measurement, and this is used to monitor therapy for selected patients. In some major cities, even genotypic resistance testing is now available. Both VL monitoring²⁰ and genotypic resistance testing at diagnosis²¹ and after treatment failure^{22,23} have been shown to improve clinical outcomes. This is because they permit early detection of a failing regimen and guide switch to a second line²⁴ before a broad cross-class resistance has evolved. Mali has an estimated 120,000 people living with HIV²⁵ and a national program which is now

treating over 10,000 with free ART. Laboratory monitoring is not covered by the program. Burkina Faso has an estimated 300,000 people living with HIV.²⁶ There, most patients are receiving ART through nongovernmental mechanisms²⁷; however, the public health system is rapidly developing ART delivery programs for HIV patients. Scale-up is occurring rapidly from a baseline of 4446 patients in April 2005 to a target of over 30,000 by 2008. In this study, we focus on virological outcomes (concentrations of plasma HIV RNA) of HIV-positive patients treated with HAART in 7 hospitals and community-based sites in Bamako (Mali) and Ougadougou (Burkina Faso) to describe treatment efficacy and identify main factors associated with inadequate virological response (IVR), defined as HIV RNA levels higher than 500 copies/mL in observational settings.

Methods

Patients

A sample of 636 HIV-infected patients treated with HAART for more than 6 months voluntarily enrolled in this study between January and October 2005 in a pilot study to assess adherence, clinical, immunological, and virological outcomes. A convenience sample of patients were recruited in 3 public hospitals (n = 406) and 3 community-based organizations (CBOs) (n = 230) in Bamako (Mali) (n = 314) and Ouagadougou (Burkina Faso) (n = 322) to provide a representative mix of public, nongovernmental, community, and hospital-based ART delivery sites. As of 2005, sites participating in our study treated from 450 to 2372 patients. To evaluate adherence and potential causes of treatment failure, patients were interviewed independently by trained staff including medical personnel or another person living with HIV using a standard questionnaire. The questionnaire covered demographic and relational characteristics, psychosocial factors, self-reported adherence, and serostatus disclosure. VL was obtained in all patients except for 30. We report the results of the remaining 606 patients for whom questionnaire and VL data were available. HAART regimens were generally combinations of 2 NRTIs with 1 NNRTI or with 1 PI. NRTIs mostly used were lamivudine (3TC) (57.4%), D-drugs [didanosine (ddI) and stavudine (d4T)] (38.6%), and zidovudine (AZT) (25.1%). NNRTIs were efavirenz (43.9%) and nevirapine (30.7%). PIs included indinavir-unboosted (15.8%) and ritonavir-unboosted (1.0%) as sole PI. Combination ART including dual combination ART (Combivir, Duovir,

[Type text]

or Avocomb) (30.2%) and triple combination ART (Triomune) (6.8%) were also available. Triple combination ART that was used was Triomune (Cipla), and dual therapies were a combination of 3TC + AZT drugs: Duovir-N (Cipla), Combivir (GlaxoSmithKline), and Avocomb (Ranbaxy). Consent for participation was obtained from all patients, and the study was approved by the Ethics Committees in Bamako, Ouagadougou, and at University of Montreal.

Clinical Data

Clinical and immunological responses to HAART were measured as part of routine checkup and medical examination but varied slightly according to site. Start and stop dates for each ARV and the most recent clinical evaluation by physician and CD4 cell count were obtained from patients' medical files. HIV-1 RNA plasma viral load (PVL) was measured in all subjects. Immunological and virological failures (VFs) were defined according to WHO guidelines. Immunological suppression (IS) was defined as CD4 count below 200 cells/mm³ and virological failure as HIV-1 RNA more than 10,000 copies/mL. VL persisting ≥ 500 c/mL after more than 6 months is a clinically significant outcome as it is prognostic for treatment failure, we defined this as inadequate virological response. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kilograms) divided by square of height (meters). Self-rated health (poor, neither good nor poor, and good) is a good predictor of health outcomes including mortality,²⁸ hence, it was also included as a proxy for patients' general health.

Variables

Variables that were selected from the standardized questionnaire were grouped into 4 categories as follows: (1) sociodemographic characteristics including age, gender, food insecurity (having often skipped a meal or reduced the amount of food intake in the last 6 months because of money), literacy (being able to read and write in French), and distance from ART delivery site (≤ 1 hour or >1 hour); (2) context of ART care including country and type of site (public hospital or CBO); (3) treatment factors including prescribed ART, ART history (treatment naive or experienced), drug formulation (3 different pills or fixed-dose ART), and patient-reported drug-related adverse events (digestive, skin rashes, arthralgia, neurological, and fatigue); and (4) behavioral factors including adherence (patient-reported number of doses missed, yesterday, the day before yesterday, and in the last 7 days, and treatment interruption) and alcohol use (yes or no).

Laboratory Methods

CD4 cells were quantified by flow cytometry (Becton Dickinson FACSCalibur™ system in Ouagadougou and FACScan in Bamako). Plasma HIV-1 RNA loads were measured in the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal laboratory using a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (Ultrasensitive Assay version 1.5; Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ), which has a lower limit of detection of 50 c/mL.

[Type text]

Statistics

The proportions of patients with IVR were compared with patients with low (<500 c/mL) or undetectable PVL (<50 c/mL) using the χ^2 statistic. The level of significance was 0.05. Factors associated with PVL \geq 500 copies/mL were analyzed in a logistic regression model using multivariate approach with staggered entry. We modeled the associations with IVR by including sociodemographic factors (country, type or ART delivery site, distance from ART delivery site, age, gender, literacy, and food insecurity), treatment factors (prescribed HAART, previous HAART usage, use of fixed-dose ART, and ART-related adverse events), behavioral factors (previous treatment interruption, 7-day adherence, and alcohol use), and clinical characteristics (BMI, CD4 cell count, and self-rated health) in 4 sequential steps. Variables from each step were selected by using stepwise backward strategy in which statistical criteria for entry and retention of variables in each model were $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.10$, respectively. Fifty-seven cases were removed from the final model due to missing information on any of the variables included in the analysis. This resulted in 549 cases selected in the final model. Results are presented as odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (95% CIs).

Results

Patients

This analysis is based on 606 patients treated with HAART for at least 6 months for whom VL and questionnaire data were available. Mean age of the study population was 38.0 6 7.9 years, and 66.8% were females. Patients were equally distributed in each country, and more than two-thirds (64%; n = 388) were treated in public hospitals as compared with CBOs (Fig. 1). Patients were divided by time on treatment into 3 groups: 6–12 months (22.4% of patients), 12–24 months (48.5%), and .24 months (29.2%). The majority of patients were on NNRTI-based regimens (83.7%), 15.4% were on PIbased regimens, and 5 patients were on a triple NRTI regimen. Fixed-dose medications with double (Duovir-N, Combivir, Avocomb) or triple (Triomune, Trizivir) ARVs were prescribed in, respectively, 30.2% and 6.8% of the patients (Table 1). Eighty-two (15.8%) patients had previously received ARVs. Pretreated patients were more likely to be females (15.9% versus 9.0%; $P = 0.021$) to be treated in Burkina Faso (17.3% versus 9.3%; $P = 0.004$) and in CBOs (19.3% versus 10.4%; $P = 0.002$). For 52 of the 82 patients who had previously received an ART, we were able to ascertain their first regimen. The majority (90.4%) had received triple ARVs as an initial regimen; only 4 patients had been previously treated with NRTI dual therapy (both NRTIs), and 1 woman reported having taken zidovudine (AZT) monotherapy during pregnancy. For their second ART, 23 patients (44.2%) were receiving an NNRTI-based regimen, 23 (44.2%) were on a PIbased regimen, and 6 (11.5%) were on a

[Type text]

triple NRTI regimen. In half the patients (26), their regimen was a fixed-dose ART (eg, Combivir). Changes in treatment were based on clinical or immunological criteria because VL quantification was not available at the time of the study. The majority of treatment switches (n = 34, 65.4%) had resulted in the substitution of only one drug. Substitutions of 2 or all drugs were observed in 15 (28.8%) and 3 (5.8%) patients, respectively. Forty-four percent of the treatment changes (23 cases) involved switching ARVs without switching classes either for toxicity or supply reasons. Among the 29 patients who switched classes, 18 switched from a PI-based regimen to an NNRTI-based regimen, 4 switched from an NRTI-only regimen to an NNRTI-based regimen, 4 switched from an NNRTI-based regimen to a PI-based regimen, and 1 patient switched from an NRTI-only regimen to a PI-based regimen. In all but one case, patients were on unboosted PIs. Treatment adherence in the entire sample was generally good with 391(64.5%) patients reporting perfect adherence in the last week and 471(77.7%) never having interrupted their treatment regimen. Of the 493 patients for whom BMI was measured, 287(58.2%) were considered to have a normal BMI, 65(13.2%) patients were considered underweight, and 141(29.6%) were overweight (Table 1).

Virological and Immunological Outcomes

More than three quarters (77.2%) of the patients had suppressed PVL below the detection level (50 c/mL), 8.7% had low detectable VL (50–499 c/mL), 14.0% had IVR, of which 70.6% (60 patients) had VF (Fig. 1). Prevalence of IVR ranged from 7.9% to 20.7% across

ART delivery sites, but the differences in the proportion of patients in each VL category between countries, types of sites, and actual ART delivery sites were not statistically significant (Fig. 1). Proportions of patients with VL ≥ 500 c/mL (IVR) were not different between time-ontreatment groups. However, differences were observed between treatment regimens and between pretreated and naive patients. Overall prevalence of virological suppression was 79% in naive patients and 68% in pretreated patients. Virological suppression was also more frequent in NNRTI-treated patients (79.6%) as compared with patients treated with other regimens (62.9%; $P < 0.001$). In Figure 2, rates of IVR are disaggregated by time on treatment, type of regimen, and history of ART use. Higher proportions of naive patients had IVR in the first year if they were on PI as compared with NNRTI. More so, a previous ART use was significantly associated with higher rates of IVR. Pretreated patients taking an NNRTI regimen were significantly more likely to have IVR in the first 2 years of treatment whereas those taking a PI regimen were significantly more likely to have IVR after their second year of treatment. One hundred forty-four (25.9%) patients did not increase their CD4 counts over the threshold of 200 cells/mm³ (IS), even though two thirds of these patients had undetectable VL. IS suppression was more common in women (31.2% versus 23.2%; $P = 0.004$) and among those who reported food insecurity in the last 6 months (33.1% versus 19.7%; $P \leq 0.001$). There were no significant differences in rates of IS according to time on treatment, treatment history, and type of HAART regimen, but patients on fixed-dose ART (Duovir + NNRTI or Triomune) were less likely to have IS (19.4% versus 30.0%; $P = 0.007$). Furthermore, rates of IS correlated well with BMI and self-rated health.

Correlates of IVR

Bivariate analysis (Table 1) indicates that there are no differences in the rates of IVR between men and women or between literate and illiterate patients. However, patients who reported living more than one hour away from their ART delivery site were more likely to have an IVR. IVR was also more frequent in patients treated with PI- and NRTI-only regimens than in patients taking NNRTIs, in patients taking more pills, and in treatment-experienced patients. None of the specific drug-related events or cumulative number of adverse events (not shown) was associated with IVR. Treatment interruptions were associated with IVR whereas partial adherence in the last week was not. As expected, clinical factors such as low BMI, self-rated health, and immunosuppression were also associated with IVR. Although only marginally significant, the relationship between BMI and HIV RNA seemed curvilinear with overweight patients having the best virological outcomes (6.1% IVR; $P = 0.061$) as compared with others with higher or lower BMI. Results of the multivariable logistic regression models are reported in Table 2. Regression models suggest that factors related to patients' sociodemographic characteristics, treatment regimen, adherence, and clinical status may all be independently associated with high HIV RNA concentration. Model 1 describes the effect of patients' sociodemographic characteristics on virological outcomes. Age, gender, or literacy and food insecurity were selected into this model; however, living more than one hour away from ART delivery site increased the odds of having an IVR (OR = 1.66; 95% CI 1.01 to 2.73). In model 2, treatment-related factors are included. In this model, PI- or NRTI-only regimens (OR = 3.12; 95% CI 1.81 to 5.38) and previous history of ART (OR = 2.32; 95% CI 1.27 to 4.22)

were associated with increased odds of having high PVL when compared with NNRTI regimens and treatment-naive patients, respectively. Once history of treatment interruption was included in model 3, the odds of having an IVR in pretreated patients slightly dropped and the association lost its significance, but the effect of other variables remained relatively unchanged. Contrary to our expectations, this finding indicates that the mechanism by which distance from site affects virological outcome is not explained by its effect on ART interruption. ART interruption was a significant predictor of poor virological outcome (OR = 2.63; 95% CI 1.57 to 4.41) once adjusted for model 1 and 2 variables. Finally, IS (3.32; 95% CI 1.94 to 5.70) and poor self-rated health (OR = 2.00; 95% CI 1.17 to 3.41) significantly increased the odds of having an IVR, and their effects were independent of distance to ART delivery sites, treatment regimen, previous ART use, and treatment interruptions. Surprisingly, the odds of IVR for patients living farther away from ART delivery sites increased with this final adjustment, suggesting that this variable interacts with either of the 2 clinical variables.

Discussion

This study describes virological and immunological responses to HAART in routine care in a large group of patients receiving treatment in a variety of hospitals and CBOs in Burkina Faso²⁹ and Mali. This multicenter 2-country study is significant as it describes treatment outcomes in representative health care settings. Overall, 76.6% and 74.6% of patients in the first, second year, and later had adequate immunological and virological outcomes, respectively. The overall prevalence of undetectable VL in treatment naive patients was 79% and 68% in pretreated patients. Rates of virological suppression in naive and pretreated patients remained stable across ART delivery sites and time on treatment. Results are encouraging given that they were neither obtained from randomized trials nor obtained from highly monitored and supervised programs. Moreover, results reported herein are superior to some of the results obtained in resource-limited contexts and are quite comparable to those obtained from middle- or high-income countries. For example, rates of undetectable VL at 12 months of 40% and 50% have been reported in Uganda³⁰ and Côte d'Ivoire.¹³ High rates of virological suppression (80%) were observed in the paying ART clinic in Blantyre (Malawi), but patient population is unlikely to be representative of HIV-positive people in need of treatment because more than half were lost to follow-up after initiating treatment.³¹ According to the number provided by the national HIV program in Mali (December 2005), 69.78% of the patients who have initiated treatment are still being routinely followed in the 3 HAART delivery sites in Bamako. Although similar information was not available for Burkina Faso, we hypothesize that patients may be more representative of HIV-infected people in our setting because the free access to treatment is

likely to improve patient retention. In Brazil, 25% of treatment-naive patients had IVR at 6 months after initiation of treatment with nonbrand name drugs.³² In a heterogeneous clinic population in the United States, one quarter of patients had IVR over a period of 2 years.³³ Strikingly similar results were observed in patients initiating HAART in North America and Europe, where 83% had attained HIV RNA < 500 c/mL at 6 months.³⁴ However, slightly higher virological outcomes were obtained from the Swiss cohort, where 90% of the naive patients and 79% of the pretreated patients had suppressed their viral RNA at 12 months.⁸ The appropriate threshold for switching regimens remains to be determined and is a research priority; in high-income countries, a confirmed detectable VL at any level after being suppressed is sufficient to switch therapy. In resource-limited settings, WHO guidelines recommend that 10,000 c/mL may be an appropriate threshold for switching.¹ Resistance testing was conducted on a subsample of 46 patients who had high viremia (858–160,000 c/mL); 33 (71%) had VL >10,000 consistent with WHO guidelines of VF and an indication for treatment switch. However, in this subgroup, 39 patients (85%) already harbored HIV with major resistance mutations.³⁵ These results suggest that an important proportion of patients with high viremia already have future treatment options compromised and would require access to second-line treatments. Immunological outcomes are a concern in these patients because 1 of 4 patients had CD4 cell count below 200 cells/mL. Immune reconstitution is challenging; some studies have reported that some patients may never have CD4 counts that exceed 200 cells/mm³ and thus never leave the zone of AIDS-defining immunosuppression.³⁶ Such low counts are associated with significantly increased odds of contracting opportunistic infections or clinical progression to AIDS.^{37,38} Our data also show that food insecurity was associated with IS, as reported

by others.³⁹ This supports recommendations for beginning treatment earlier in contexts where immune reconstitution may be a challenge, for instance in contexts where malnutrition, poor hygiene, and infectious diseases are prevalent.⁴⁰ As would be expected, treatment interruptions, low CD4 count, and poor self-rated health were associated with treatment failure, consistent with the SMART study on treatment interruption.⁴¹ The results of studies evaluating differences in responses based on gender or socioeconomic background have been inconsistent. Nevertheless, poor socioeconomic conditions and low literacy have not been reported to be major obstacles for proper adherence and therapeutic success in resource-limited settings⁴² or in more marginalized populations in high-income countries.⁴³ This is in line with our findings showing a lack of association between literacy or demographic factors and treatment failure. However, geographic distance from ART delivery site was identified as predictor for poor virological outcome in our sample, and contrary to our expectations, the effect of this factor was not explained by the fact that it may be a barrier for proper adherence.¹⁷ Because ART delivery mechanisms in this study varied greatly with regard to infrastructure, human resources, management culture, services to person living with HIV, and patient characteristics, neither selection bias nor sitespecific factors would explain these results. We believe these results to be generalizable to the whole population of people living with HIV in these 2 countries. A rate of 14.7% of IVR response to ART suggests that, in these patients, the risk of treatment failure and resistance is significant. IVR was associated with treatment regimen, history of ART, and previous treatment interruption. We measured adherence with 2 questions: having ever interrupted the current treatment regimen and having forgotten one or more doses in the last week. The former was associated with IVR whereas the latter was not. Part of the reason for the

absence of association between self-reported last week adherence and virological response may be that this measure is more susceptible to social desirability bias than reporting events that date further back. Another potential explanation for this is that patients may have been more likely to report treatment interruptions if these events consisted of longer or more significant numbers of pills missed and less likely to report missing 1 pill in the last week. Nevertheless, our results suggest that events outside the patient's control leading to treatment interruptions may also contribute to IVR as does actual patient behavior. This underscores the importance of developing strategies to support adherence over the long term. PI-based regimens and NRTI-only regimens have poorer efficacy than NNRTI-based regimens—even when adjusted for ART history and adherence. NRTI-only regimens are known to be less effective than HAART regimens with a PI or an NNRTI,³³ and PIs have also been reported to be less effective than NNRTI regimens.⁴⁴ The association between IVR and treatment with a PI-containing regimen is explained by the fact that the majority (93.8%) of these patients were taking unboosted indinavir, which is known to have low genetic barrier and to be less effective than boosted PIs.⁴⁵ Indinavir is a challenging drug to use as it requires strict dosing and, in our experience, is particularly poorly tolerated with patients often experiencing recurrent nausea, vomiting, and diarrhea. This is reflected in a higher switch rate from PIs than from NNRTIs. As treatment switches were not guided by VL response but by clinical factors, the majority of switches were for tolerability reasons. Only 2 patients had a complete regimen switch for presumed treatment failure. This study was limited by its cross-sectional design. Single time-point measurement of VL made it impossible to determine whether a VL of more than 500 c/mL was a single “blip” or represented persistent viremia, which selects for resistance and is associated with treatment

failure.⁴⁶ Similarly, it was not possible to distinguish whether patients with CD4 <200 cells/mm³ were true immunological failures as these patients may still be able to reconstitute their immune systems to above 200 cells/mm³ with more time. This was a convenience sample of patients recruited at ART delivery sites during routine examinations; none of the respondents were hospitalized at the time of the study. Although refusal rates were low, patients volunteering for this study might have better health.

Conclusions

These results suggest that, even without significant external inputs, sufficient expertise and dedication exist in public hospital and community-based programs to achieve rates of treatment success comparable to better-resourced settings. That self-reported treatment interruptions were associated with IVR whereas self-reported partial adherence in the past week suggests that structural factors outside the control of patients may be more important than behavioural factors in this resource-poor setting. In this study, structural factors outside the control of patients included geographic distance from care sites, availability and accessibility of ART including type of regimen (eg, use of regimens containing indinavir as an unboosted PI), and absence of VL monitoring. Because IVR is not detected in the absence of VL monitoring, in these minority of patients with treatment failures, future salvage options may be compromised as continued treatment with a suboptimal regimen that will lead to broad cross-class resistance. Further research is needed on determinants of treatment success and IVR. Adherence must be measured at the level of ART availability and accessibility and individual behavior. Even in the absence of accessible VL

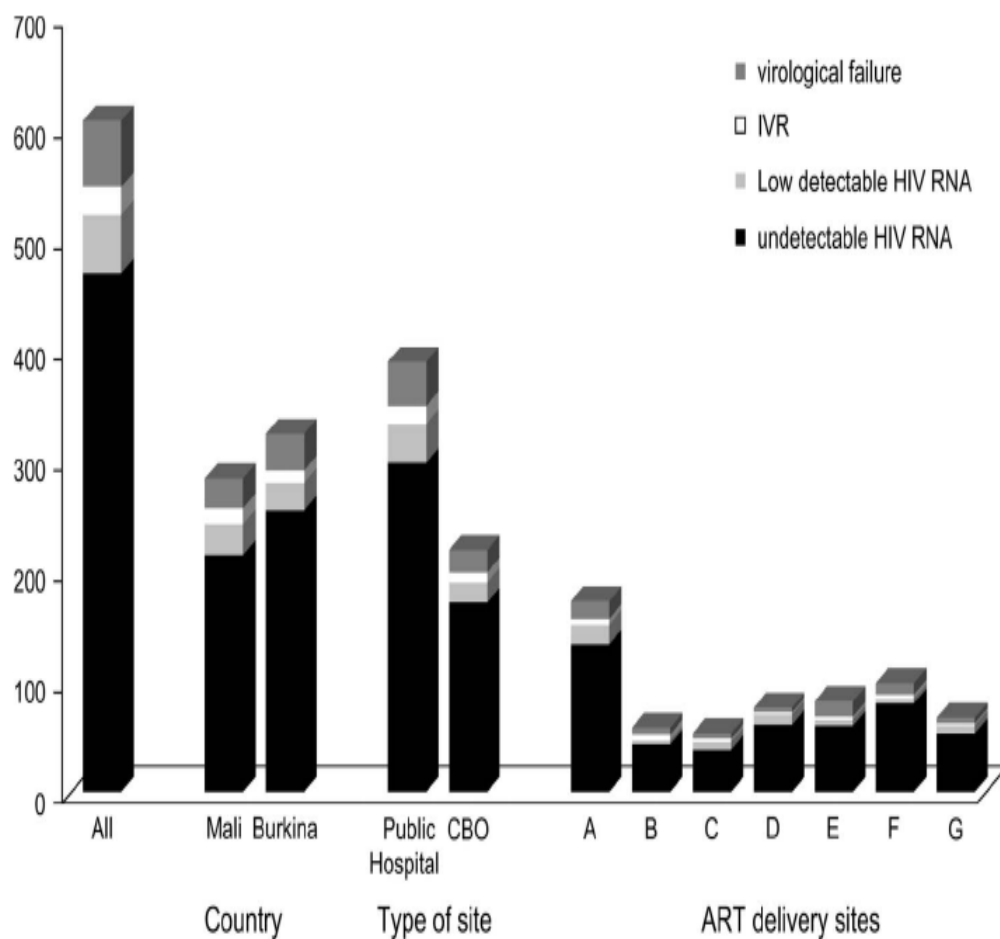
monitoring, ongoing operations research using VL as a gold standard will be needed to develop easily usable screening tools to predict IVR. This suggests that ARV rollout programs need to include strengthening of health care delivery capacity, adherence support programs, and monitoring and drug distribution.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the work done by every researcher and clinician collaborating in the ATARAO project. These include Prof. Flabou Bougoudogo (INRSP-Bamako), Prof. Hamar Alassane Traoré (Hôpital National du Point G, Service de Médecine Interne Bamako), Dr Souleymane Ag Aboubacrine (Hôpital National du Point G, Service de Médecine Interne Bamako), Dr Daouda Minta (Hôpital National du Point G, Service des Maladies Infectieuses, Bamako), Dr Seydou Coulibaly (Hôpital National du Point G, Pharmacie, Bamako), Prof. Moussa Maïga (Hôpital Gabriel Touré, Bamako), Dr Abdoulaye Kallé (Hôpital Gabriel Touré, Bamako), Dr Dramane Koné (Hôpital Gabriel Touré, Pharmacie, Bamako), Dr Mamadou Cissé (CESAC, Bamako), Dr Ousmane Traoré (CESAC, Pharmacie, Bamako), Prof. Somita Keïta (CNAM, Bamako), Dr Mohamed Sylla (Projet SIDA-3, Bamako), Issoufou Tiendrébéogo (AAS, Ouagadougou), Dr Samuel Koala (AAS, Ouagadougou), Laure Salembéré (ALAVI, Ouagadougou), Dr Alain Ouermi (ALAVI, Ouagadougou), Prof. Joseph Drabo (CHU-Yalgado-Ouédraogo, Service de Médecine Interne, Ouagadougou), Dr Ismaël Diallo (CHU-Yalgado-Ouédraogo, Service de Médecine Interne, Ouagadougou), Prof. Adama Traoré (CHU-Yalgado- Ouédraogo, Service de Dermatologie, Ouagadougou), Dr Pascal Niamba (CHU-Yalgado-Ouédraogo, Service de Dermatologie, Ouagadougou), Dr Maria-Victoria Zunzunegui (Université de Montréal, Unité de Santé Internationale). We would also like to thank the interviewers (Ali Djerma, Idrissa Coulibaly, Cheickné Touré, Saliou Mahamadou), laboratory technicians (Issa Cissé; INRSP and Leon Sawadogo; CNLAT), and pharmacists for their contribution

to this work. Finally, we express our appreciation to all the participants who generously volunteered to give a blood sample and be interviewed for this study.

FIGURE 1. Number of patients with undetectable PVL, low detectable PVL, IVR, and with VF. Undetectable PVL was <50 plasma HIV RNA copies/mL; low detectable PVL was 50–499 plasma HIV RNA copies/mL; IVR was ≥ 500 plasma HIV RNA copies/mL; and VF was $\geq 10,000$ plasma HIV RNA copies/mL.



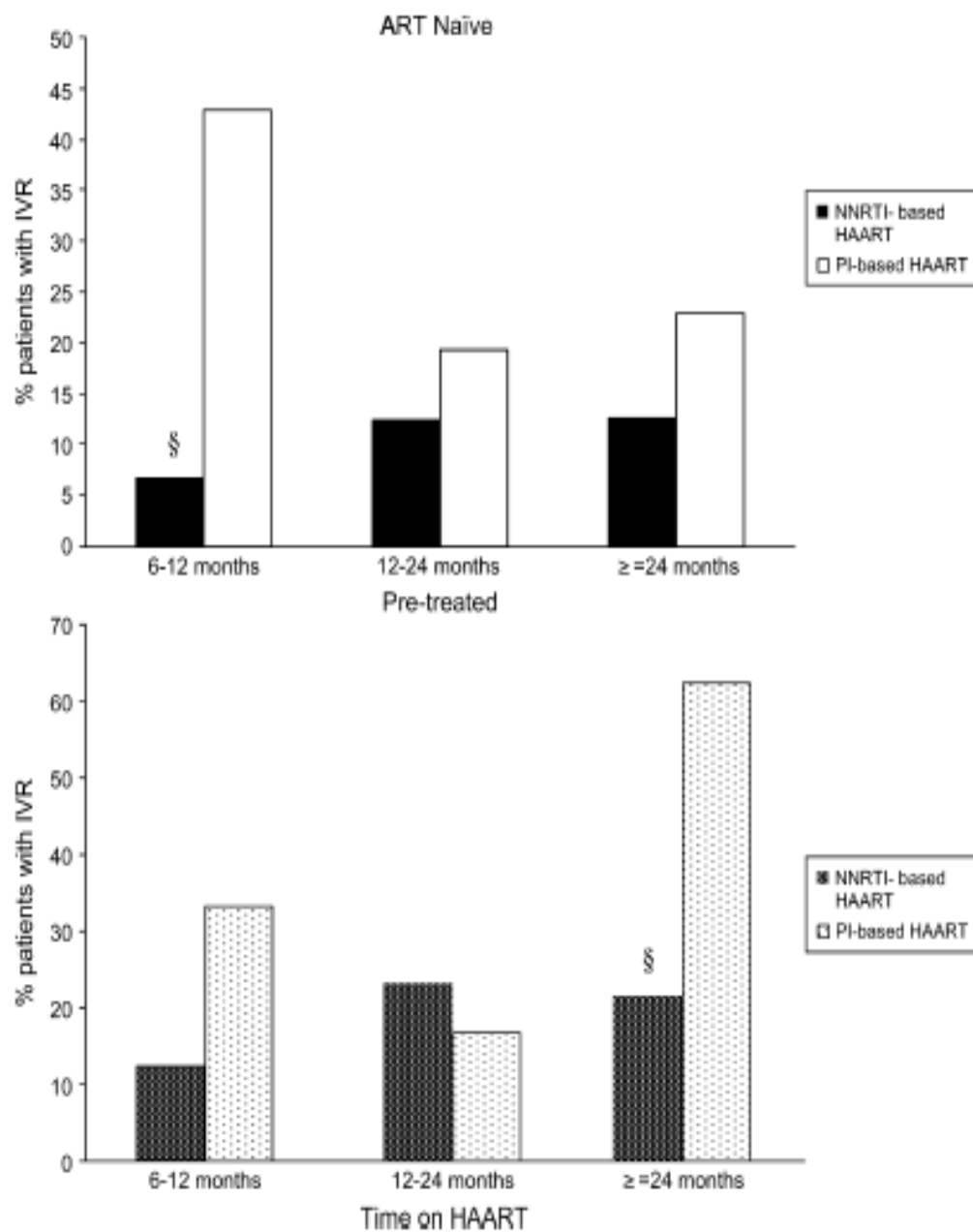


FIGURE 2. Percent patients with plasma HIV RNA ≥ 500 copies/mL according to time on treatment and type of regimen. § Difference between NNRTI- and PI-containing ART is significant at $P < 0.050$.

TABLE 2. Multivariate Logistic Regression of PVL ≥ 500 Copies/mL in Patients Taking HAART Effect of Behavioral, Treatment, and Clinical Factors

	Model 1 (Sociodemographics)			Model 2 (Sociodemographics + ART)			Model 3 (Sociodemographics + ART + Behavior)			Model 4 (Sociodemographics + ART + Behavior + Clinical)						
	95% CI			95% CI			95% CI			95% CI						
	OR	Low	Up	P	OR	Low	Up	P	OR	Low	Up	P				
Sociodemographics																
>1 hr to get to ART delivery site	1.66	1.01	2.73	0.046	1.83	1.08	3.11	0.025	1.90	1.12	3.22	0.017	2.48	1.40	4.39	0.002
Treatment																
PI based or NRTI only	—	—	—	—	3.12	1.81	5.38	0.025	2.85	1.66	4.90	<0.001	3.23	1.79	5.82	<0.001
Pre-treated (experienced)	—	—	—	—	2.32	1.27	4.22	0.006	1.78	0.96	3.29	0.066	1.78	0.92	3.43	0.088
Behavioral																
Interrupted HAART	—	—	—	—	—	—	—	—	2.63	1.57	4.41	<0.001	2.56	1.35	4.15	0.003
Clinical																
Poor or average self-rated health	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.00	1.17	3.41	0.011
IS*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.32	1.94	5.70	<0.001

Adjusted ORs and 95% CIs.

*CD4 cell count <200 cells/ μ L.

References

1. World Health Organization. Antiretroviral Therapy for HIV in Adults and Adolescents: Recommendations for a Public Health Approach. WHO Press; Geneva, Switzerland. 2006:1–134.
2. Phillips AN, Miller V, Sabin C, et al. Durability of HIV-1 viral suppression over 3.3 years with multi-drug antiretroviral therapy in previously drugnaive individuals. *AIDS*. 2001;15:2379–2384.
3. Bartlett J, DeMasi R, Quinn J, et al. overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-1 infected adults. *AIDS*. 2001;15:1369–1377.
4. Harrigan PR, Hogg RS, Dong WW, et al. Predictors of HIV drugresistance mutations in a large antiretroviral-naive cohort initiating triple antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2005;191:339–347.
5. Wood E, Hogg RS, Yip B, et al. Impact of baseline viral load and adherence on survival of HIV-infected adults with baseline CD4 cell counts \geq 200 cells/microl. *AIDS*. 2006;20:1117–1123.
6. Skowron G, Street JC, Obee EM. Baseline CD4(+) cell count, not viral load, correlates with virologic suppression induced by potent antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;28:313–319.
7. Abgrall S, Duval X, Joly V, et al. Clinical and immunologic outcome in patients with human immunodeficiency virus infection, according to virologic efficacy in the year after virus undetectability, during antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1517–1526.

8. Ledergerber B, Egger M, Opravil M, et al. Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. Swiss HIV Cohort Study. *Lancet*. 1999;353: 863–868.
9. Anastos K, Gange SJ, Lau B, et al. Association of race and gender with HIV-1 RNA levels and immunologic progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;24:218–226
10. Ivers LC, Kendrick D, Doucette K. Efficacy of antiretroviral therapy programs in resource-poor settings: a meta-analysis of the published literature. *Clin Infect Dis*. 2005;41:217–224.
11. Laurent C, Diakhate N, Gueye NF, et al. The Senegalese government's highly active antiretroviral therapy initiative: an 18-month follow-up study. *AIDS*. 2002;16:1363–1370.
12. Seyler C, Anglaret X, Dakoury-Dogbo N, et al. Medium-term survival, morbidity and immunovirological evolution in HIV-infected adults receiving antiretroviral therapy, Abidjan, Cote d'Ivoire. *Antivir Ther*. 2003;8:385–393.
13. Djomand G, Roels T, Ellerbrock T, et al. Virologic and immunologic outcomes and programmatic challenges of an antiretroviral treatment pilot project in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS*. 2003;17 (Suppl 3):S5–S15.
14. Kebba A, Atwine D, Mwebaze R, et al. Therapeutic responses to AZT + 3TC + EFV in advanced antiretroviral naive HIV type 1-infected Ugandan patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18:1181–1187.
15. Byakika-Tusiime J, Oyugi JH, Tumwirikize WA, et al. Adherence to HIV antiretroviral therapy in HIV+ Ugandan patients purchasing therapy. *Int J STD AIDS*. 2005;16:38–41.

16. Coetzee D, Hildebrand K, Boulle A, et al. Outcomes after two years of providing antiretroviral treatment in Khayelitsha, South Africa. *AIDS*. 2004;18:887–895.
17. Hardon AP, Akurut D, Comoro C, et al. Hunger, waiting time and transport costs: time to confront challenges to ART adherence in Africa. *AIDS Care*. 2007;19:658–665.
18. Garcia F, de Lazzari E, Plana M, et al. Long-term CD4+ T-cell response to highly active antiretroviral therapy according to baseline CD4+ T-cell count. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;36:702–713.
19. Walensky RP, Weinstein MC, Yazdanpanah Y, et al. HIV drug resistance surveillance for prioritizing treatment in resource-limited settings. *AIDS*. 2007;21:973–982.
20. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, et al. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. ACTG 241 Protocol Virology Substudy Team. *Ann Intern Med*. 1997;126:929–938.
21. Boden D, Hurley A, Zhang L, et al. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA*. 1999;282:1135–1141.
22. Weinstein MC, Goldie SJ, Losina E, et al. Use of genotypic resistance testing to guide HIV therapy: clinical impact and cost-effectiveness. *Ann Intern Med*. 2001;134:440–450.
23. Torre D, Tambini R. Antiretroviral drug resistance testing in patients with HIV-1 infection: a meta-analysis study. *HIV Clin Trials*. 2002;3:1–8.
24. Jones S, Klotman ME. Impact of genotypic resistance testing on physician selection of antiretroviral therapy. *J Hum Virol*. 2001;4:214–216.

25. UNAIDS/WHO. Epidemiological Fact Sheets on HIV/AIDS and Sexually Transmitted Infections. Mali; August 2006.
26. UNAIDS/WHO. Epidemiological Fact Sheets on HIV/AIDS and Sexually Transmitted Infections. Burkina Faso: UNAIDS/WHO; Geneva, Switzerland. August 2006.
27. Nguyen VK, Grennan T, Peschard K, et al. Antiretroviral use in Ouagadougou, Burkina Faso. *AIDS*. 2003;17:S109–S111.
28. Idler EL, Benyamini Y. Self-rated health and mortality: a review of twenty-seven community studies. *J Health Soc Behav*. 1997;38: 21–37.
29. Lagarde E, Congo Z, Meda N, et al. Epidemiology of HIV infection in urban Burkina Faso. *Int J STD AIDS*. 2004;15:395–402.
30. Weidle PJ, Malamba S, Mwebaze R, et al. Assessment of a pilot antiretroviral drug therapy programme in Uganda: patients' response, survival, and drug resistance. *Lancet*. 2002;360:34–40.
31. van Oosterhout JJ, Bodasing N, Kumwenda JJ, et al. Evaluation of antiretroviral therapy results in a resource-poor setting in Blantyre, Malawi. *Trop Med Int Health*. 2005;10:464–470.
32. May SB, Barroso PF, Nunes EP, et al. Effectiveness of highly active antiretroviral therapy using non-brand name drugs in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:551–555.
33. Robbins GK, Daniels B, Zheng H, et al. Predictors of antiretroviral treatment failure in an urban HIV clinic. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;1:30–37.

34. May MT, Sterne JA, Costagliola D, et al. HIV treatment response and prognosis in Europe and North America in the first decade of highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis. *Lancet*. 2006;368: 451–458.
35. Sylla M, Chamberland A, Boileau C, et al. ATARAO Group. Characterization of drug resistance in antiretroviral-treated patients infected with HIV-1 CRF02_AG and AGK subtypes in Mali and BurkinaFaso. *Antivir Ther*. 2008;13:141–148.
36. Dronda F, Moreno S, Moreno A, et al. Long-term outcomes among antiretroviral-naive human immunodeficiency virus-infected patients with small increases in CD4+ cell counts after successful virologic suppression. *Clin Infect Dis*. 2002;35:1005–1009.
37. Egger M, May M, Chene G, et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet*. 2002;360:119–129.
38. Ledergerber B, Egger M, Erard V, et al. AIDS-related opportunistic illnesses occurring after initiation of potent antiretroviral therapy: the Swiss HIV Cohort Study. *JAMA*. 1999;282:2220–2226.
39. Paton NI, Sangeetha S, Earnest A, et al. The impact of malnutrition on survival and the CD4 count response in HIV-infected patients starting antiretroviral therapy. *HIV Med*. 2006;7:323–330.
40. Braitstein P, Brinkhof MW, Dabis F, et al. Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet*. 2006;367:817–824.

41. Julg B, Goebel FD. Treatment interruption in HIV therapy: a SMART strategy? *Infection*. 2006;34:186–188.
42. Mills EJ, Nachega JB, Buchan I, et al. Adherence to antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa and North America: a meta-analysis. *JAMA*. 2006; 296:679–690.
43. Paasche-Orlow MK, Cheng DM, Palepu A, et al. Health literacy, antiretroviral adherence, and HIV-RNA suppression: a longitudinal perspective. *J Gen Intern Med*. 2006;21:835–840.
44. Weiser SD, Guzman D, Riley ED, et al. Higher rates of viral suppression with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors compared to single protease inhibitors are not explained by better adherence. *HIV Clin Trials*. 2004;5:278–287.
45. Boyd MA, Srasuebkul P, Khongphattanyothin M, et al. Boosted versus unboosted indinavir with zidovudine and lamivudine in nucleoside pretreated patients: a randomized, open-label trial with 112 weeks of followup (HIV-NAT 005). *Antivir Ther*. 2006;11:223–232.
46. Sungkanuparph S, Groger RK, Overton ET, et al. Persistent low-level viraemia and virological failure in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med*. 2006;7:437–441.

6. Bibliographie

1. UNAIDS/WHO. Rapport sur l'épidémie mondiale de sida 2008. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 2008:364.
2. Follow-up on Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1981;30:409-10.
3. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1981;30:305-8.
4. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1981;30:250-2.
5. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1981;305:1425-31.
6. Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982;31:365-7.
7. Goldbach PD, Mohsenifar Z, Medici MA, Lee S, Smith S. Pneumocystis carinii pneumonia in an apparently nonimmunocompromised patient. South Med J 1982;75:1256-8.
8. 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. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983;220:868-71.
9. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M.

- Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:865-7.
10. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984;225:840-2.
 11. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 1985;40:9-17.
 12. Alizon M, Wain-Hobson S, Montagnier L, Sonigo P. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell* 1986;46:63-74.
 13. Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988;242:1168-71.
 14. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe

SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler

- R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
15. Janeway C. *Microbiology*. 6 edition ed. Oxford: Garland Science; 2004.
 16. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 2001;26:13-33.
 17. Ono A, Freed EO. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13925-30.
 18. Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984;312:763-7.
 19. Maddon PJ, Dalglish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986;47:333-48.
 20. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998;393:648-59.
 21. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998;393:705-11.
 22. Geyer H, Holschbach C, Hunsmann G, Schneider J. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J Biol Chem* 1988;263:11760-7.

23. Weiss CD, Levy JA, White JM. Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 1990;64:5674-7.
24. Earl PL, Doms RW, Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:648-52.
25. Salzwedel K, Berger EA. 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* 2000;97:12794-9.
26. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. 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* 1990;265:10373-82.
27. Sanders RW, van Anken E, Nabatov AA, Liscaljet IM, Bontjer I, Eggink D, Melchers M, Busser E, Dankers MM, Groot F, Braakman I, Berkhout B, Paxton WA. The carbohydrate at asparagine 386 on HIV-1 gp120 is not essential for protein folding and function but is involved in immune evasion. *Retrovirology* 2008;5:10.
28. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667-73.
29. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-7.

30. Dong HF, Wigmore K, Carrington MN, Dean M, Turpin JA, Howard OM. Variants of CCR5, which are permissive for HIV-1 infection, show distinct functional responses to CCL3, CCL4 and CCL5. *Genes Immun* 2005;6:609-19.
31. Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, Yang BG, Hayasaka H, Miyasaka M. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci* 2005;96:317-22.
32. Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 1992;66:3183-7.
33. Milich L, Margolin B, Swanstrom R. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J Virol* 1993;67:5623-34.
34. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996;273:1856-62.
35. Philpott S, Burger H, Charbonneau T, Grimson R, Vermund SH, Visosky A, Nachman S, Kovacs A, Tropper P, Frey H, Weiser B. CCR5 genotype and resistance to vertical transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;21:189-93.

36. Wilkinson DA, Operskalski EA, Busch MP, Mosley JW, Koup RA. A 32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness. *J Infect Dis* 1998;178:1163-6.
37. Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by *ccr5delta32*. *J Biol Chem* 1997;272:30603-6.
38. 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. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996;2:1240-3.
39. Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N, Choe H, Sodroski J, Newman W, Koup RA, Mackay CR. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med* 1997;185:1681-91.
40. Eckert DM, Kim PS. Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11187-92.
41. Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 2001;70:777-810.
42. Cole JL, Garsky VM. Thermodynamics of peptide inhibitor binding to HIV-1 gp41. *Biochemistry* 2001;40:5633-41.

43. Eckert DM, Malashkevich VN, Hong LH, Carr PA, Kim PS. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell* 1999;99:103-15.
44. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson MR, Nowak MA, Shaw GM, Saag MS. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 1998;4:1302-7.
45. Wild C, Greenwell T, Matthews T. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:1051-3.
46. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002;418:646-50.
47. Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* 2004;430:569-73.
48. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 2004;427:848-53.
49. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7096-100.

50. Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res* 2005;15:923-34.
51. Ciuffi A, Bushman FD. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. *Trends Genet* 2006;22:388-95.
52. Yoder KE, Bushman FD. Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *J Virol* 2000;74:11191-200.
53. Li M, Craigie R. Virology: HIV goes nuclear. *Nature* 2006;441:581-2.
54. Carteau S, Hoffmann C, Bushman F. Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target. *J Virol* 1998;72:4005-14.
55. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003;300:1749-51.
56. Yamashita M, Emerman M. Capsid is a dominant determinant of retrovirus infectivity in nondividing cells. *J Virol* 2004;78:5670-8.
57. Adams M, Sharmeen L, Kimpton J, Romeo JM, Garcia JV, Peterlin BM, Groudine M, Emerman M. Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3862-6.
58. Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 2002;8:673-80.
59. Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 1998;92:451-62.

60. Zhou Q, Sharp PA. Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. *EMBO J* 1995;14:321-8.
61. Ensoli B, Fiorelli V, Ensoli F, Lazzarin A, Visintini R, Narciso P, Di Carlo A, Monini P, Magnani M, Garaci E. The therapeutic phase I trial of the recombinant native HIV-1 Tat protein. *AIDS* 2008;22:2207-9.
62. Cullen BR. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* 1998;249:203-10.
63. Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 1998;52:491-532.
64. Rein A, Henderson LE, Levin JG. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci* 1998;23:297-301.
65. Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 1998;251:1-15.
66. Wilk T, Gross I, Gowen BE, Rutten T, de Haas F, Welker R, Krausslich HG, Boulanger P, Fuller SD. Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2001;75:759-71.
67. Gottlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3195-9.
68. Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Cote M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI. Tsg101

- and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 2001;107:55-65.
69. VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa TJ, Agresta B, Kikonyogo A, Leis J, Carter CA. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7724-9.
 70. Conticello SG, Thomas CJ, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* 2005;22:367-77.
 71. Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 2004;4:868-77.
 72. Liddament MT, Brown WL, Schumacher AJ, Harris RS. APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* 2004;14:1385-91.
 73. Mehle A, Goncalves J, Santa-Marta M, McPike M, Gabuzda D. Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev* 2004;18:2861-6.
 74. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 2003;302:1056-60.
 75. Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 1992;258:1938-41.

76. Dyer WB, Geczy AF, Kent SJ, McIntyre LB, Blasdall SA, Learmont JC, Sullivan JS. Lymphoproliferative immune function in the Sydney Blood Bank Cohort, infected with natural nef/long terminal repeat mutants, and in other long-term survivors of transfusion-acquired HIV-1 infection. *AIDS* 1997;11:1565-74.
77. Hofmann-Lehmann R, Vlasak J, Williams AL, Chenine AL, McClure HM, Anderson DC, O'Neil S, Ruprecht RM. Live attenuated, nef-deleted SIV is pathogenic in most adult macaques after prolonged observation. *AIDS* 2003;17:157-66.
78. Garcia JV, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 1991;350:508-11.
79. Stove V, Van de Walle I, Naessens E, Coene E, Stove C, Plum J, Verhasselt B. Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alpha. *J Virol* 2005;79:11422-33.
80. Swigut T, Shohdy N, Skowronski J. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J* 2001;20:1593-604.
81. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 1996;2:338-42.
82. Schindler M, Wurfl S, Benaroch P, Greenough TC, Daniels R, Easterbrook P, Brenner M, Munch J, Kirchhoff F. Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J Virol* 2003;77:10548-56.

83. Arora VK, Molina RP, Foster JL, Blakemore JL, Chernoff J, Fredericksen BL, Garcia JV. Lentivirus Nef specifically activates Pak2. *J Virol* 2000;74:11081-7.
84. Fauci AS. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 1996;384:529-34.
85. Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* 1988;240:80-2.
86. Koot M, Schellekens PT, Mulder JW, Lange JM, Roos MT, Coutinho RA, Tersmette M, Miedema F. Viral phenotype and T cell reactivity in human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic men treated with zidovudine. *J Infect Dis* 1993;168:733-6.
87. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M. 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* 1992;66:1354-60.
88. Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 1989;63:2118-25.
89. Guy-Grand D, Vassalli P. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1993;5:247-52.

90. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 1997;156:145-66.
91. Veazey RS, Mansfield KG, Tham IC, Carville AC, Shvetz DE, Forand AE, Lackner AA. Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2000;74:11001-7.
92. Di Mascio M, Paik CH, Carrasquillo JA, Maeng JS, Jang BS, Shin IS, Srinivasula S, Byrum R, Neria A, Kopp W, Catalfamo M, Nishimura Y, Reimann K, Martin M, Lane HC. Non-invasive in vivo imaging of CD4 cells in SHIV infected non-human primates. *Blood* 2009.
93. Hussain LA, Lehner T. Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia. *Immunology* 1995;85:475-84.
94. Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, Tiffany HL, Farber JM, Peden KW, Murphy PM, Golding H. CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 1998;161:3103-13.
95. 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. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000;100:587-97.
96. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000;100:575-85.

97. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, Heldebrant C, Smith R, Conrad A, Kleinman SH, Busch MP. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 2003;17:1871-9.
98. 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. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7552-7.
99. Lehner T, Wang Y, Pido-Lopez J, Whittall T, Bergmeier LA, Babaahmady K. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. *Vaccine* 2008;26:2997-3001.
100. Lehner T, Wang Y, Cranage M, Tao L, Mitchell E, Bravery C, Doyle C, Pratt K, Hall G, Dennis M, Villinger L, Bergmeier L. Up-regulation of beta-chemokines and down-modulation of CCR5 co-receptors inhibit simian immunodeficiency virus transmission in non-human primates. *Immunology* 2000;99:569-77.
101. Milone MC, Fitzgerald-Bocarsly P. The mannose receptor mediates induction of IFN-alpha in peripheral blood dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses. *J Immunol* 1998;161:2391-9.

102. Cho SS, Bacon CM, Sudarshan C, Rees RC, Finbloom D, Pine R, O'Shea JJ. Activation of STAT4 by IL-12 and IFN- α : evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. *J Immunol* 1996;157:4781-9.
103. Rogge L, D'Ambrosio D, Biffi M, Penna G, Minetti LJ, Presky DH, Adorini L, Sinigaglia F. The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J Immunol* 1998;161:6567-74.
104. Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999;189:521-30.
105. Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MS, Schooley RT. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 1987;328:345-8.
106. Yang OO, Walker BD. CD8⁺ cells in human immunodeficiency virus type I pathogenesis: cytolytic and noncytolytic inhibition of viral replication. *Adv Immunol* 1997;66:273-311.
107. Yang OO, Kalams SA, Rosenzweig M, Trocha A, Jones N, Koziel M, Walker BD, Johnson RP. Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1996;70:5799-806.
108. Gandhi RT, Walker BD. Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med* 2002;53:149-72.
109. Doherty PC, Zinkernagel RM. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 1975;256:50-2.
110. Zinkernagel RM. Response: Immunology Taught by Darwin. *Science* 1996;272:635a.

111. Tang J, Costello C, Keet IP, Rivers C, Leblanc S, Karita E, Allen S, Kaslow RA. HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:317-24.
112. Frahm N, Adams S, Kiepiela P, Linde CH, Hewitt HS, Lichterfeld M, Sango K, Brown NV, Pae E, Wurcel AG, Altfeld M, Feeney ME, Allen TM, Roach T, St John MA, Daar ES, Rosenberg E, Korber B, Marincola F, Walker BD, Goulder PJ, Brander C. HLA-B63 presents HLA-B57/B58-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes and is associated with low human immunodeficiency virus load. *J Virol* 2005;79:10218-25.
113. Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med* 2001;344:1668-75.
114. Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuane H, Carrington M, O'Brien S, Andrieu JM, Schachter F, Zagury D, Rappaport J, Winkler C, Nelson GW, Zagury JF. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol* 1999;162:6942-6.
115. Itescu S, Mathur-Wagh U, Skovron ML, Brancato LJ, Marmor M, Zeleniuch-Jacquotte A, Winchester R. HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5:37-45.
116. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah AJ, Goedert JJ, Winkler C, O'Brien SJ, Rinaldo C, Detels R, Blattner W, Phair J, Erlich H, Mann

- DL. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996;2:405-11.
117. Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, Rathnavalu P, Moore C, Pfafferott KJ, Hilton L, Zimbwa P, Moore S, Allen T, Brander C, Addo MM, Altfeld M, James I, Mallal S, Bunce M, Barber LD, Szinger J, Day C, Klenerman P, Mullins J, Korber B, Coovadia HM, Walker BD, Goulder PJ. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 2004;432:769-75.
118. Magierowska M, Theodorou I, Debre P, Sanson F, Autran B, Riviere Y, Charron D, Costagliola D. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* 1999;93:936-41.
119. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Selig SM, Schwartz D, Sullivan J, Connors M. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2709-14.
120. O'Brien SJ, Gao X, Carrington M. HLA and AIDS: a cautionary tale. *Trends Mol Med* 2001;7:379-81.
121. Sahmoud T, Laurian Y, Gazengel C, Sultan Y, Gautreau C, Costagliola D. Progression to AIDS in French haemophiliacs: association with HLA-B35. *AIDS* 1993;7:497-500.
122. Altfeld M, Addo MM, Shankarappa R, Lee PK, Allen TM, Yu XG, Rathod A, Harlow J, O'Sullivan K, Johnston MN, Goulder PJ, Mullins JI, Rosenberg ES,

- Brander C, Korber B, Walker BD. Enhanced detection of human immunodeficiency virus type 1-specific T-cell responses to highly variable regions by using peptides based on autologous virus sequences. *J Virol* 2003;77:7330-40.
123. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* 2001;75:11983-91.
124. Edwards BH, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan MJ, Goepfert PA. Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J Virol* 2002;76:2298-305.
125. Frahm N, Korber BT, Adams CM, Szinger JJ, Draenert R, Addo MM, Feeney ME, Yusim K, Sango K, Brown NV, SenGupta D, Piechocka-Trocha A, Simonis T, Marincola FM, Wurcel AG, Stone DR, Russell CJ, Adolf P, Cohen D, Roach T, StJohn A, Khatri A, Davis K, Mullins J, Goulder PJ, Walker BD, Brander C. Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J Virol* 2004;78:2187-200.
126. Masemola A, Mashishi T, Houry G, Mohube P, Mokgotho P, Vardas E, Colvin M, Zijenah L, Katzenstein D, Musonda R, Allen S, Kumwenda N, Taha T, Gray G, McIntyre J, Karim SA, Sheppard HW, Gray CM. Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load. *J Virol* 2004;78:3233-43.

127. Zuniga R, Lucchetti A, Galvan P, Sanchez S, Sanchez C, Hernandez A, Sanchez H, Frahm N, Linde CH, Hewitt HS, Hildebrand W, Altfeld M, Allen TM, Walker BD, Korber BT, Leitner T, Sanchez J, Brander C. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J Virol* 2006;80:3122-5.
128. Frahm N, Kiepiela P, Adams S, Linde CH, Hewitt HS, Sango K, Feeney ME, Addo MM, Lichterfeld M, Lahaie MP, Pae E, Wurcel AG, Roach T, St John MA, Altfeld M, Marincola FM, Moore C, Mallal S, Carrington M, Heckerman D, Allen TM, Mullins JI, Korber BT, Goulder PJ, Walker BD, Brander C. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat Immunol* 2006;7:173-8.
129. Honeyborne I, Prendergast A, Pereyra F, Leslie A, Crawford H, Payne R, Reddy S, Bishop K, Moodley E, Nair K, van der Stok M, McCarthy N, Rousseau CM, Addo M, Mullins JI, Brander C, Kiepiela P, Walker BD, Goulder PJ. Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B*13 and targeting of multiple gag-specific CD8⁺ T-cell epitopes. *J Virol* 2007;81:3667-72.
130. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mncube Z, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Nair K, Khan N, Crawford H, Payne R, Leslie A, Prado J, Prendergast A, Frater J, McCarthy N, Brander C, Learn GH, Nickle D, Rousseau C, Coovadia H, Mullins JI, Heckerman D, Walker BD, Goulder P. CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 2007;13:46-53.

131. Leslie A, Price DA, Mkhize P, Bishop K, Rathod A, Day C, Crawford H, Honeyborne I, Asher TE, Luzzi G, Edwards A, Rousseau CM, Mullins JI, Tudor-Williams G, Novelli V, Brander C, Douek DC, Kiepiela P, Walker BD, Goulder PJ. Differential selection pressure exerted on HIV by CTL targeting identical epitopes but restricted by distinct HLA alleles from the same HLA supertype. *J Immunol* 2006;177:4699-708.
132. Chen Y, Winchester R, Korber B, Gagliano J, Bryson Y, Hutto C, Martin N, McSherry G, Petru A, Wara D, Ammann A. Influence of HLA alleles on the rate of progression of vertically transmitted HIV infection in children: association of several HLA-DR13 alleles with long-term survivorship and the potential association of HLA-A*2301 with rapid progression to AIDS. Long-Term Survivor Study. *Hum Immunol* 1997;55:154-62.
133. Keet IP, Tang J, Klein MR, LeBlanc S, Enger C, Rivers C, Apple RJ, Mann D, Goedert JJ, Miedema F, Kaslow RA. Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1999;180:299-309.
134. Malhotra U, Holte S, Dutta S, Berrey MM, Delpit E, Koelle DM, Sette A, Corey L, McElrath MJ. Role for HLA class II molecules in HIV-1 suppression and cellular immunity following antiretroviral treatment. *J Clin Invest* 2001;107:505-17.
135. Kroner BL, Goedert JJ, Blattner WA, Wilson SE, Carrington MN, Mann DL. Concordance of human leukocyte antigen haplotype-sharing, CD4 decline and AIDS in hemophilic siblings. Multicenter Hemophilia Cohort and Hemophilia Growth and Development Studies. *AIDS* 1995;9:275-80.

136. Klasse PJ, Sattentau QJ. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J Gen Virol* 2002;83:2091-108.
137. Pierson TC, Doms RW. HIV-1 entry and its inhibition. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003;281:1-27.
138. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998;280:1884-8.
139. Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP. V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:171-89.
140. Binley JM, Wrin T, Korber B, Zwick MB, Wang M, Chappey C, Stiegler G, Kunert R, Zolla-Pazner S, Katinger H, Petropoulos CJ, Burton DR. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* 2004;78:13232-52.
141. Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Ruker F, Katinger H. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993;67:6642-7.
142. Purtscher M, Trkola A, Gruber G, Buchacher A, Predl R, Steindl F, Tauer C, Berger R, Barrett N, Jungbauer A, et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1651-8.
143. Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Voglauer R, Steindl F, Katinger H. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:1757-65.

144. Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, Moore JP, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 2001;75:10892-905.
145. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:201-8.
146. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2003;21:265-304.
147. Atkinson K, Hansen JA, Storb R, Goehle S, Goldstein G, Thomas ED. T-cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-suppressor subsets. *Blood* 1982;59:1292-8.
148. Watanabe N, De Rosa SC, Cmelak A, Hoppe R, Herzenberg LA, Roederer M. Long-term depletion of naive T cells in patients treated for Hodgkin's disease. *Blood* 1997;90:3662-72.
149. Klimas N, Koneru AO, Fletcher MA. Overview of HIV. *Psychosom Med* 2008;70:523-30.
150. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992;41:1-19.
151. Egger M, Hirschel B, Francioli P, Sudre P, Wirz M, Flepp M, Rickenbach M, Malinverni R, Vernazza P, Battegay M. Impact of new antiretroviral combination

- therapies in HIV infected patients in Switzerland: prospective multicentre study. Swiss HIV Cohort Study. *BMJ* 1997;315:1194-9.
152. Mocroft A, Katlama C, Johnson AM, Pradier C, Antunes F, Mulcahy F, Chiesi A, Phillips AN, Kirk O, Lundgren JD. AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study. *Lancet* 2000;356:291-6.
153. Mocroft A, Vella S, Benfield TL, Chiesi A, Miller V, Gargalianos P, d'Arminio Monforte A, Yust I, Bruun JN, Phillips AN, Lundgren JD. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. *Lancet* 1998;352:1725-30.
154. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:853-60.
155. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, Markowitz M, Ho DD. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997;387:188-91.
156. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, Macken CA, Perelson AS, Markowitz M, Ho DD. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000;6:82-5.
157. Dornadula G, Zhang H, VanUitert B, Stern J, Livornese L, Jr., Ingerman MJ, Witek J, Kedanis RJ, Natkin J, DeSimone J, Pomerantz RJ. Residual HIV-1 RNA in blood

- plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA* 1999;282:1627-32.
158. Yerly S, Kaiser L, Perneger TV, Cone RW, Opravil M, Chave JP, Furrer H, Hirschel B, Perrin L. Time of initiation of antiretroviral therapy: impact on HIV-1 viraemia. The Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* 2000;14:243-9.
159. Hermankova M, Ray SC, Ruff C, Powell-Davis M, Ingersoll R, D'Aquila RT, Quinn TC, Siliciano JD, Siliciano RF, Persaud D. HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy. *JAMA* 2001;286:196-207.
160. Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, Dewar RL, Planta A, Liu S, Metcalf JA, Mellors JW, Coffin JM. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 2003;41:4531-6.
161. Sharkey ME, Teo I, Greenough T, Sharova N, Luzuriaga K, Sullivan JL, Bucy RP, Kostrikis LG, Haase A, Veryard C, Davaro RE, Cheeseman SH, Daly JS, Bova C, Ellison RT, 3rd, Mady B, Lai KK, Moyle G, Nelson M, Gazzard B, Shaunak S, Stevenson M. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000;6:76-81.
162. Arlen PA, Brooks DG, Gao LY, Vatakis D, Brown HJ, Zack JA. Rapid expression of human immunodeficiency virus following activation of latently infected cells. *J Virol* 2006;80:1599-603.
163. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD,

- Richman DD, Siliciano RF. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997;278:1295-300.
164. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997;387:183-8.
165. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* 1995;1:1284-90.
166. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13193-7.
167. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999;5:512-7.
168. Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* 2001;75:6710-3.
169. Sol-Foulon N, Moris A, Nobile C, Boccaccio C, Engering A, Abastado JP, Heard JM, van Kooyk Y, Schwartz O. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in

- dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity* 2002;16:145-55.
170. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janotta F, Aksamit A, Martin MA, Fauci AS. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 1986;233:1089-93.
171. Livingstone WJ, Moore M, Innes D, Bell JE, Simmonds P. Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. *Lancet* 1996;348:649-54.
172. Moutsinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S, Unutmaz D. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* 2002;195:869-79.
173. Pomerantz RJ. Reservoirs, sanctuaries, and residual disease: the hiding spots of HIV-1. *HIV Clin Trials* 2003;4:137-43.
174. Schragger LK, D'Souza MP. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *JAMA* 1998;280:67-71.
175. Gunthard HF, Havlir DV, Fiscus S, Zhang ZQ, Eron J, Mellors J, Gulick R, Frost SD, Brown AJ, Schleif W, Valentine F, Jonas L, Meibohm A, Ignacio CC, Isaacs R, Gamagami R, Emini E, Haase A, Richman DD, Wong JK. Residual human immunodeficiency virus (HIV) Type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *J Infect Dis* 2001;183:1318-27.

176. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993;362:355-8.
177. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Desrosiers RC, Lackner AA. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 1998;280:427-31.
178. Epstein LG, Kuiken C, Blumberg BM, Hartman S, Sharer LR, Clement M, Goudsmit J. HIV-1 V3 domain variation in brain and spleen of children with AIDS: tissue-specific evolution within host-determined quasispecies. *Virology* 1991;180:583-90.
179. Hughes ES, Bell JE, Simmonds P. Investigation of the dynamics of the spread of human immunodeficiency virus to brain and other tissues by evolutionary analysis of sequences from the p17gag and env genes. *J Virol* 1997;71:1272-80.
180. Korber BT, Kunstman KJ, Patterson BK, Furtado M, McEvilly MM, Levy R, Wolinsky SM. Genetic differences between blood- and brain-derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: evidence of conserved elements in the V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences. *J Virol* 1994;68:7467-81.
181. Kiessling AA, Fitzgerald LM, Zhang D, Chhay H, Brettler D, Eyre RC, Steinberg J, McGowan K, Byrn RA. Human immunodeficiency virus in semen arises from a genetically distinct virus reservoir. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14 Suppl 1:S33-41.

182. Nuovo GJ, Forde A, MacConnell P, Fahrenwald R. In situ detection of PCR-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor cDNA in cervical tissues. *Am J Pathol* 1993;143:40-8.
183. Pomerantz RJ, de la Monte SM, Donegan SP, Rota TR, Vogt MW, Craven DE, Hirsch MS. Human immunodeficiency virus (HIV) infection of the uterine cervix. *Ann Intern Med* 1988;108:321-7.
184. Vernazza PL, Eron JJ, Cohen MS, van der Horst CM, Troiani L, Fiscus SA. Detection and biologic characterization of infectious HIV-1 in semen of seropositive men. *AIDS* 1994;8:1325-9.
185. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 2003;9:727-8.
186. Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, He Y, Vesanen M, Lewin S, Talal A, Racz P, Perelson AS, Korber BT, Markowitz M, Ho DD. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999;340:1605-13.
187. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME, O'Shea MA, Hallahan CW, Daucher M, Ward DJ, Moir S, Mullins JI, Kovacs C, Fauci AS. HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J Clin Invest* 2005;115:3250-5.
188. Ramratnam B, Ribeiro R, He T, Chung C, Simon V, Vanderhoeven J, Hurley A, Zhang L, Perelson AS, Ho DD, Markowitz M. Intensification of antiretroviral therapy accelerates the decay of the HIV-1 latent reservoir and decreases, but does

- not eliminate, ongoing virus replication. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:33-7.
189. Laughlin MA, Zeichner S, Kolson D, Alwine JC, Seshamma T, Pomerantz RJ, Gonzalez-Scarano F. Sodium butyrate treatment of cells latently infected with HIV-1 results in the expression of unspliced viral RNA. *Virology* 1993;196:496-505.
190. Van Lint C, Emiliani S, Ott M, Verdin E. Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J* 1996;15:1112-20.
191. Chun TW, Engel D, Mizell SB, Hallahan CW, Fischette M, Park S, Davey RT, Jr., Dybul M, Kovacs JA, Metcalf JA, Mican JM, Berrey MM, Corey L, Lane HC, Fauci AS. Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4+ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 1999;5:651-5.
192. Guadalupe M, Sankaran S, George MD, Reay E, Verhoeven D, Shacklett BL, Flamm J, Wegelin J, Prindiville T, Dandekar S. Viral suppression and immune restoration in the gastrointestinal mucosa of human immunodeficiency virus type 1-infected patients initiating therapy during primary or chronic infection. *J Virol* 2006;80:8236-47.
193. Strain MC, Little SJ, Daar ES, Havlir DV, Gunthard HF, Lam RY, Daly OA, Nguyen J, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD, Wong JK. Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J Infect Dis* 2005;191:1410-8.

194. Chun TW, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Maenza J, Mullins JI, Collier AC, Corey L, Fauci AS. Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus. *J Infect Dis* 2007;195:1762-4.
195. Smith RJ, Aggarwala BD. Can the viral reservoir of latently infected CD4(+) T cells be eradicated with antiretroviral HIV drugs? *J Math Biol* 2009.
196. Culshaw RV, Ruan S, Webb G. A mathematical model of cell-to-cell spread of HIV-1 that includes a time delay. *J Math Biol* 2003;46:425-44.
197. Hadjiandreou M, Conejeros R, Vassiliadis VS. Towards a long-term model construction for the dynamic simulation of HIV infection. *Math Biosci Eng* 2007;4:489-504.
198. Jones LE, Perelson AS. Transient viremia, plasma viral load, and reservoir replenishment in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:483-93.
199. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brenchley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 2009.
200. Nickle DC, Shriner D, Mittler JE, Frenkel LM, Mullins JI. Importance and detection of virus reservoirs and compartments of HIV infection. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:410-6.
201. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kucherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. Long-term

- control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2009;360:692-8.
202. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999;397:436-41.
203. Chastel C CG. Epidémies bactériennes et virales d'origine zoonotique. Rôle de la chasse et du dépeçage d'animaux sauvages. *Bull Soc Pathol Exot* 2004;97:207-12.
204. Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6588-92.
205. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000;288:1789-96.
206. Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* 2001;58:19-42.
207. Berry N, Jaffar S, Schim van der Loeff M, Ariyoshi K, Harding E, N'Gom PT, Dias F, Wilkins A, Ricard D, Aaby P, Tedder R, Whittle H. Low level viremia and high CD4% predict normal survival in a cohort of HIV type-2-infected villagers. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1167-73.
208. Holmgren B, da Silva Z, Vastrup P, Larsen O, Andersson S, Ravn H, Aaby P. Mortality associated with HIV-1, HIV-2, and HTLV-I single and dual infections in a middle-aged and older population in Guinea-Bissau. *Retrovirology* 2007;4:85.

209. Jaffar S, Van der Loeff MS, Eugen-Olsen J, Vincent T, Sarje-Njie R, Ngom P, Meyer AM, Berry N, Aaby P, Whittle H. Immunological predictors of survival in HIV type 2-infected rural villagers in Guinea-Bissau. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:560-4.
210. Lisse IM, Poulsen AG, Aaby P, Knudsen K, Dias F. Serial CD4 and CD8 T-lymphocyte counts and associated mortality in an HIV-2-infected population in Guinea-Bissau. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;13:355-62.
211. N'Gom PT, Jaffar S, Ricard D, Wilkins A, Ariyoshi K, Morgan G, Da Silva AP, Whittle HC. Immune stimulation by syphilis and malaria in HIV-2-infected and uninfected villagers in West Africa. *Br J Biomed Sci* 1997;54:251-5.
212. Poulsen AG, Aaby P, Larsen O, Jensen H, Naucner A, Lisse IM, Christiansen CB, Dias F, Melbye M. 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet* 1997;349:911-4.
213. Yamaguchi J, Devare SG, Brennan CA. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:925-30.
214. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 2006;313:523-6.
215. 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. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 2008;455:661-4.
216. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008;358:1590-602.
217. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006;20:W13-23.
218. Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* 2007;81:10209-19.
219. Laeyendecker O LX, Arroyo M, et al. The effect of HIV subtype on rapid disease progression in Rakai, Uganda [abstract 44LB]. In: Program and abstracts of 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Denver) Alexandria, VA: Foundation for Retrovirology and Human Health 2006.
220. Overbaugh J, Bangham CR. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science* 2001;292:1106-9.
221. Rainwater S, DeVange S, Sagar M, Ndinya-Achola J, Mandaliya K, Kreiss JK, Overbaugh J. No evidence for rapid subtype C spread within an epidemic in which multiple subtypes and intersubtype recombinants circulate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:1060-5.
222. Carr JK, Salminen MO, Koch C, Gotte D, Artenstein AW, Hegerich PA, St Louis D, Burke DS, McCutchan FE. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* 1996;70:5935-43.

223. Gao F, Robertson DL, Morrison SG, Hui H, Craig S, Decker J, Fultz PN, Girard M, Shaw GM, Hahn BH, Sharp PM. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* 1996;70:7013-29.
224. Domingo E. Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin Diagn Virol* 1998;10:97-101.
225. Eigen M. Viral quasispecies. *Sci Am* 1993;269:42-9.
226. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*; 1996, pp. 1582-6.
227. Burke DS. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. *Emerg Infect Dis* 1997;3:253-9.
228. Hu WS, Temin HM. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 1990;250:1227-33.
229. Temin HM. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:6900-3.
230. Wain-Hobson S. Human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in vivo and ex vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;176:181-93.
231. Henry KR, Weber J, Quinones-Mateu ME, Arts EJ. The impact of viral and host elements on HIV fitness and disease progression. *Curr HIV/AIDS Rep* 2007;4:36-41.
232. Quinones-Mateu ME, Ball SC, Marozsan AJ, Torre VS, Albright JL, Vanham G, van Der Groen G, Colebunders RL, Arts EJ. A dual infection/competition assay

- shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. *J Virol* 2000;74:9222-33.
233. Troyer RM, Collins KR, Abraha A, Fraundorf E, Moore DM, Krizan RW, Toossi Z, Colebunders RL, Jensen MA, Mullins JI, Vanham G, Arts EJ. Changes in human immunodeficiency virus type 1 fitness and genetic diversity during disease progression. *J Virol* 2005;79:9006-18.
234. Tebit DM, Nankya I, Arts EJ, Gao Y. HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness "fit" into the puzzle? *AIDS Rev* 2007;9:75-87.
235. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellett A, Chatfield C, Lawson VA, Crowe S, Maerz A, Sonza S, Learmont J, Sullivan JS, Cunningham A, Dwyer D, Dowton D, Mills J. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995;270:988-91.
236. Huang Y, Zhang L, Ho DD. Biological characterization of nef in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1995;69:8142-6.
237. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:228-32.
238. 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.

239. Gavel Y, von Heijne G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* 1990;3:433-42.
240. Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, Korber B. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* 2004;14:1229-46.
241. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 2005;433:834-41.
242. Chackerian B, Rudensey LM, Overbaugh J. Specific N-linked and O-linked glycosylation modifications in the envelope V1 domain of simian immunodeficiency virus variants that evolve in the host alter recognition by neutralizing antibodies. *J Virol* 1997;71:7719-27.
243. Koch M, Pancera M, Kwong PD, Kolchinsky P, Grundner C, Wang L, Hendrickson WA, Sodroski J, Wyatt R. Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* 2003;313:387-400.
244. 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;74:6769-76.
245. Willey RL, Shibata R, Freed EO, Cho MW, Martin MA. Differential glycosylation, virion incorporation, and sensitivity to neutralizing antibodies of human

- immunodeficiency virus type 1 envelope produced from infected primary T-lymphocyte and macrophage cultures. *J Virol* 1996;70:6431-6.
246. Derdeyn CA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Mokili JL, Muldoon M, Denham SA, Heil ML, Kasolo F, Musonda R, Hahn BH, Shaw GM, Korber BT, Allen S, Hunter E. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* 2004;303:2019-22.
247. Belair M, Dovat M, Foley B, Mayerat C, Pantaleo G, Graziosi C. The polymorphic nature of HIV type 1 env V4 affects the patterns of potential N-glycosylation sites in proviral DNA at the intrahost level. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:199-206.
248. Castro E, Belair M, Rizzardi GP, Bart PA, Pantaleo G, Graziosi C. Independent evolution of hypervariable regions of HIV-1 gp120: V4 as a swarm of N-Linked glycosylation variants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:106-13.
249. Korber BT, Allen EE, Farmer AD, Myers GL. Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2. *AIDS* 1995;9 Suppl A:S5-18.
250. Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JI. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999;73:10489-502.
251. Wain-Hobson S. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:878-83.
252. Draenert R, Allen TM, Liu Y, Wrin T, Chappey C, Verrill CL, Sirera G, Eldridge RL, Lahaie MP, Ruiz L, Clotet B, Petropoulos CJ, Walker BD, Martinez-Picado J.

- Constraints on HIV-1 evolution and immunodominance revealed in monozygotic adult twins infected with the same virus. *J Exp Med* 2006;203:529-39.
253. 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. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18514-9.
254. Dacheux L, Moreau A, Ataman-Onal Y, Biron F, Verrier B, Barin F. Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. *J Virol* 2004;78:12625-37.
255. 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. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003;422:307-12.
256. Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, et al. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 1991;354:453-9.
257. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB, Shaw GM. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997;3:205-11.

258. Evans DT, Jing P, Allen TM, O'Connor DH, Horton H, Venham JE, Piekarczyk M, Dzuris J, Dykhuzen M, Mitchen J, Rudersdorf RA, Pauza CD, Sette A, Bontrop RE, DeMars R, Watkins DI. Definition of five new simian immunodeficiency virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes and their restricting major histocompatibility complex class I molecules: evidence for an influence on disease progression. *J Virol* 2000;74:7400-10.
259. Friedrich TC, McDermott AB, Reynolds MR, Piaskowski S, Fuenger S, De Souza IP, Rudersdorf R, Cullen C, Yant LJ, Vojnov L, Stephany J, Martin S, O'Connor DH, Wilson N, Watkins DI. Consequences of cytotoxic T-lymphocyte escape: common escape mutations in simian immunodeficiency virus are poorly recognized in naive hosts. *J Virol* 2004;78:10064-73.
260. Goulder PJ, Brander C, Tang Y, Tremblay C, Colbert RA, Addo MM, Rosenberg ES, Nguyen T, Allen R, Trocha A, Altfeld M, He S, Bunce M, Funkhouser R, Pelton SI, Burchett SK, McIntosh K, Korber BT, Walker BD. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* 2001;412:334-8.
261. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, McMichael AJ, Rowland-Jones S. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 1997;3:212-7.
262. Koenig S, Conley AJ, Brewah YA, Jones GM, Leath S, Boots LJ, Davey V, Pantaleo G, Demarest JF, Carter C, et al. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T

- lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat Med* 1995;1:330-6.
263. Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, Tang Y, Holmes EC, Allen T, Prado JG, Altfeld M, Brander C, Dixon C, Ramduth D, Jeena P, Thomas SA, St John A, Roach TA, Kupfer B, Luzzi G, Edwards A, Taylor G, Lyall H, Tudor-Williams G, Novelli V, Martinez-Picado J, Kiepiela P, Walker BD, Goulder PJ. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 2004;10:282-9.
264. Milicic A, Edwards CT, Hue S, Fox J, Brown H, Pillay T, Drijfhout JW, Weber JN, Holmes EC, Fidler SJ, Zhang HT, Phillips RE. Sexual transmission of single human immunodeficiency virus type 1 virions encoding highly polymorphic multisite cytotoxic T-lymphocyte escape variants. *J Virol* 2005;79:13953-62.
265. O'Connor DH, Allen TM, Vogel TU, Jing P, DeSouza IP, Dodds E, Dunphy EJ, Melsaether C, Mothe B, Yamamoto H, Horton H, Wilson N, Hughes AL, Watkins DI. Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. *Nat Med* 2002;8:493-9.
266. Pillay T, Zhang HT, Drijfhout JW, Robinson N, Brown H, Khan M, Moodley J, Adhikari M, Pfafferott K, Feeney ME, St John A, Holmes EC, Coovadia HM, Klenerman P, Goulder PJ, Phillips RE. Unique acquisition of cytotoxic T-lymphocyte escape mutants in infant human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2005;79:12100-5.
267. Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, Bangham CR, Phillips RE. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte

- escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1890-5.
268. Wedekind JE, Dance GS, Sowden MP, Smith HC. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet* 2003;19:207-16.
269. Fitzgibbon JE, Mazar S, Dubin DT. A new type of G-->A hypermutation affecting human immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:833-8.
270. Rose PP, Korber BT. Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G --> A hypermutation. *Bioinformatics* 2000;16:400-1.
271. Deeks SG, Abrams DI. Genotypic-resistance assays and antiretroviral therapy. *Lancet* 1997;349:1489-90.
272. Deeks SG, Smith M, Holodniy M, Kahn JO. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. *JAMA* 1997;277:145-53.
273. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ, Jr., Feinberg JE, Balfour HH, Jr., Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 1997;337:725-33.
274. Hecht FM. Measuring HIV treatment adherence in clinical practice. *AIDS Clin Care* 1998;10:57-9.
275. Hecht FM, Grant RM, Petropoulos CJ, Dillon B, Chesney MA, Tian H, Hellmann NS, Bandrapalli NI, Digilio L, Branson B, Kahn JO. Sexual transmission of an

- HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N Engl J Med* 1998;339:307-11.
276. McDonald CK, Kuritzkes DR. Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Arch Intern Med* 1997;157:951-9.
277. De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:307-20.
278. Larder BA, Kemp SD. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 1989;246:1155-8.
279. Flexner C. HIV drug development: the next 25 years. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:959-66.
280. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 2008;16:138-45.
281. Calvez V, Costagliola D, Descamps D, Yvon A, Collin G, Cecile A, Delaugerre C, Damond F, Marcelin AG, Matheron S, Simon A, Valantin MA, Katlama C, Brun-Vezinet F. Impact of stavudine phenotype and thymidine analogues mutations on viral response to stavudine plus lamivudine in ALTIS 2 ANRS trial. *Antivir Ther* 2002;7:211-8.
282. Kuritzkes DR, Bassett RL, Hazelwood JD, Barrett H, Rhodes RA, Young RK, Johnson VA. Rate of thymidine analogue resistance mutation accumulation with zidovudine- or stavudine-based regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;36:600-3.

283. Lin PF, Gonzalez CJ, Griffith B, Friedland G, Calvez V, Ferchal F, Schinazi RF, Shepp DH, Ashraf AB, Wainberg MA, Soriano V, Mellors JW, Colonna RJ. Stavudine resistance: an update on susceptibility following prolonged therapy. *Antivir Ther* 1999;4:21-8.
284. Pellegrin I, Izopet J, Reynes J, Denayrolles M, Montes B, Pellegrin JL, Massip P, Puel J, Fleury H, Segondy M. Emergence of zidovudine and multidrug-resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naive patients receiving stavudine plus didanosine combination therapy. STADI Group. *AIDS* 1999;13:1705-9.
285. Descamps D, Collin G, Loussert-Ajaka I, Saragosti S, Simon F, Brun-Vezinet F. HIV-1 group O sensitivity to antiretroviral drugs. *AIDS* 1995;9:977-8.
286. Quinones-Mateu ME, Albright JL, Mas A, Soriano V, Arts EJ. Analysis of pol gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998;72:9002-15.
287. Deshpande A, Jauvin V, Magnin N, Pinson P, Faure M, Masquelier B, Aurillac-Lavignolle V, Fleury HJ. Resistance mutations in subtype C HIV type 1 isolates from Indian patients of Mumbai receiving NRTIs plus NNRTIs and experiencing a treatment failure: resistance to AR. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:335-40.
288. Grossman Z, Istomin V, Averbuch D, Lorber M, Risenberg K, Levi I, Chowes M, Burke M, Bar Yaacov N, Schapiro JM. Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. *AIDS* 2004;18:909-15.

289. Palmer S, Alaeus A, Albert J, Cox S. Drug susceptibility of subtypes A,B,C,D, and E human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:157-62.
290. Descamps D, Apetrei C, Collin G, Damond F, Simon F, Brun-Vezinet F. Naturally occurring decreased susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors. *AIDS* 1998;12:1109-11.
291. Adje C, Cheingsong R, Roels TH, Maurice C, Djomand G, Verbiest W, Hertogs K, Larder B, Monga B, Peeters M, Eholie S, Bissagene E, Coulibaly M, Respass R, Wiktor SZ, Chorba T, Nkengasong JN. High prevalence of genotypic and phenotypic HIV-1 drug-resistant strains among patients receiving antiretroviral therapy in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;26:501-6.
292. Kantor R, Zijenah LS, Shafer RW, Mutetwa S, Johnston E, Lloyd R, von Lieven A, Israelski D, Katzenstein DA. HIV-1 subtype C reverse transcriptase and protease genotypes in Zimbabwean patients failing antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1407-13.
293. Weidle PJ, Kityo CM, Mugenyi P, Downing R, Kebba A, Pieniazek D, Respass R, Hertogs K, De Vroey V, Dehertogh P, Bloor S, Larder B, Lackritz E. Resistance to antiretroviral therapy among patients in Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;26:495-500.
294. Rhee SY, Kantor R, Katzenstein DA, Camacho R, Morris L, Sirivichayakul S, Jorgensen L, Brigido LF, Schapiro JM, Shafer RW. HIV-1 pol mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes. *AIDS* 2006;20:643-51.

295. Martinez-Cajas JL, Pai NP, Klein MB, Wainberg MA. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections : a systematic review of evidence (1996-2008). *J Int AIDS Soc* 2009;12:11.
296. Novitsky V, Wester CW, DeGruttola V, Bussmann H, Gaseitsiwe S, Thomas A, Moyo S, Musonda R, Van Widenfelt E, Marlink RG, Essex M. The reverse transcriptase 67N 70R 215Y genotype is the predominant TAM pathway associated with virologic failure among HIV type 1C-infected adults treated with ZDV/ddI-containing HAART in southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:868-78.
297. Barth RE, Wensing AM, Tempelman HA, Moraba R, Schuurman R, Hoepelman AI. Rapid accumulation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-associated resistance: evidence of transmitted resistance in rural South Africa. *AIDS* 2008;22:2210-2.
298. Marconi VC, Sunpath H, Lu Z, Gordon M, Koranteng-Apeageyi K, Hampton J, Carpenter S, Giddy J, Ross D, Holst H, Losina E, Walker BD, Kuritzkes DR. Prevalence of HIV-1 drug resistance after failure of a first highly active antiretroviral therapy regimen in KwaZulu Natal, South Africa. *Clin Infect Dis* 2008;46:1589-97.
299. Tebit DM, Sangare L, Makamtse A, Yameogo S, Somlare H, Bado G, Kouldiaty BG, Sathiandee K, Tiba F, Sanou I, Ouedraogo-Traore R, Zoungrana L, Diallo I, Drabo JY, Krausslich HG. HIV drug resistance pattern among HAART-exposed patients with suboptimal virological response in Ouagadougou, Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;49:17-25.

300. Montes B, Vergne L, Peeters M, Reynes J, Delaporte E, Segondy M. Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:329-36.
301. Brenner BG, Oliveira M, Doualla-Bell F, Moisi DD, Ntemgwa M, Frankel F, Essex M, Wainberg MA. HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS* 2006;20:F9-13.
302. Doualla-Bell F, Avalos A, Brenner B, Gaolathe T, Mine M, Gaseitsiwe S, Oliveira M, Moisi D, Ndwapi N, Moffat H, Essex M, Wainberg MA. High prevalence of the K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates from infected patients in Botswana treated with didanosine-based regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4182-5.
303. Gupta RK, Chrystie IL, O'Shea S, Mullen JE, Kulasegaram R, Tong CY. K65R and Y181C are less prevalent in HAART-experienced HIV-1 subtype A patients. *AIDS* 2005;19:1916-9.
304. Gonzales MJ, Wu TD, Taylor J, Belitskaya I, Kantor R, Israelski D, Chou S, Zolopa AR, Fessel WJ, Shafer RW. Extended spectrum of HIV-1 reverse transcriptase mutations in patients receiving multiple nucleoside analog inhibitors. *AIDS* 2003;17:791-9.
305. Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:785-92.

306. Soares EA, Santos RP, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, Soares MA. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;34:520-6.
307. Hsu LY, Subramaniam R, Bacheler L, Paton NI. Characterization of mutations in CRF01_AE virus isolates from antiretroviral treatment-naive and -experienced patients in Singapore. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;38:5-13.
308. Eshleman SH, Hoover DR, Chen S, Hudelson SE, Guay LA, Mwatha A, Fiscus SA, Mmiro F, Musoke P, Jackson JB, Kumwenda N, Taha T. Nevirapine (NVP) resistance in women with HIV-1 subtype C, compared with subtypes A and D, after the administration of single-dose NVP. *J Infect Dis* 2005;192:30-6.
309. Eshleman SH, Guay LA, Mwatha A, Brown ER, Cunningham SP, Musoke P, Mmiro F, Jackson JB. Characterization of nevirapine resistance mutations in women with subtype A vs. D HIV-1 6-8 weeks after single-dose nevirapine (HIVNET 012). *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:126-30.
310. Lee EJ, Kantor R, Zijenah L, Sheldon W, Emel L, Mateta P, Johnston E, Wells J, Shetty AK, Coovadia H, Maldonado Y, Jones SA, Mofenson LM, Contag CH, Bassett M, Katzenstein DA. Breast-milk shedding of drug-resistant HIV-1 subtype C in women exposed to single-dose nevirapine. *J Infect Dis* 2005;192:1260-4.
311. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Clarke J, Sirivichayakul S, Soares MA, Snoeck J, Pillay C, Rudich H, Rodrigues R, Holguin A, Ariyoshi K, Bouzas MB, Cahn P, Sugiura W, Soriano V, Brigido LF, Grossman Z, Morris L, Vandamme AM, Tanuri A, Phanuphak P, Weber JN, Pillay D, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Shafer RW. Impact of HIV-1 subtype and

- antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med* 2005;2:e112.
312. Kantor R, Shafer RW, Katzenstein D. The HIV-1 Non-subtype B Workgroup: an international collaboration for the collection and analysis of HIV-1 non-subtype B data. *MedGenMed* 2005;7:71.
313. Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:336-42.
314. Chaix ML, Rouet F, Kouakoussui KA, Laguide R, Fassinou P, Montcho C, Blanche S, Rouzioux C, Msellati P. Genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in highly active antiretroviral therapy-treated children in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:1072-6.
315. Sukasem C, Churdboonchart V, Sukeepaisarncharoen W, Piroj W, Inwisai T, Tiensuwan M, Chantratita W. Genotypic resistance profiles in antiretroviral-naive HIV-1 infections before and after initiation of first-line HAART: impact of polymorphism on resistance to therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:277-81.
316. Abecasis AB, Deforche K, Snoeck J, Bachelier LT, McKenna P, Carvalho AP, Gomes P, Camacho RJ, Vandamme AM. Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *AIDS* 2005;19:1799-806.
317. Dumans AT, Soares MA, Machado ES, Hue S, Brindeiro RM, Pillay D, Tanuri A. Synonymous genetic polymorphisms within Brazilian human immunodeficiency

- virus Type 1 subtypes may influence mutational routes to drug resistance. *J Infect Dis* 2004;189:1232-8.
318. Masquelier B, Lemoigne E, Pellegrin I, Douard D, Sandler B, Fleury HJ. Primary infection with zidovudine-resistant HIV. *N Engl J Med* 1993;329:1123-4.
319. Colson P, Ravaux I, Yahi N, Tourres C, Gallais H, Tamalet C. Transmission of HIV-1 variants resistant to the three classes of antiretroviral agents: implications for HIV therapy in primary infection. *AIDS* 2002;16:507-9.
320. Vergne L DS, Kouanfack C et al. Primary HIV-1 drug resistance in Africa: two examples in Burkina Faso and in Cameroon. Third European HIV Drug Resistance Workshop, Athens 2005:Abstr. 5.
321. Shet A RL, Hogan C et al. Transmission of drug resistant HIV-1 among subjects with acute and early HIV-1 infection in 2003 to 2004. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston 2005:Abstr. 289.
322. Sagar M, Lavreys L, Baeten JM, Richardson BA, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Kreiss JK, Overbaugh J. Identification of modifiable factors that affect the genetic diversity of the transmitted HIV-1 population. *AIDS* 2004;18:615-9.
323. Cantor THJaC. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press; 1969.
324. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981;17:368-76.
325. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111-20.
326. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 1985;22:160-74.

327. McNearney T, Hornickova Z, Markham R, Birdwell A, Arens M, Saah A, Ratner L. Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10247-51.
328. Delwart EL, Pan H, Sheppard HW, Wolpert D, Neumann AU, Korber B, Mullins JI. Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J Virol* 1997;71:7498-508.
329. Wolfs TF, Zwart G, Bakker M, Goudsmit J. HIV-1 genomic RNA diversification following sexual and parenteral virus transmission. *Virology* 1992;189:103-10.
330. Zhang LQ, MacKenzie P, Cleland A, Holmes EC, Brown AJ, Simmonds P. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J Virol* 1993;67:3345-56.
331. Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993;261:1179-81.
332. Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ, Whetsell AJ, Furtado MR, Cao Y, Ho DD, Safrin JT. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 1996;272:537-42.
333. Pang S, Shlesinger Y, Daar ES, Moudgil T, Ho DD, Chen IS. Rapid generation of sequence variation during primary HIV-1 infection. *AIDS* 1992;6:453-60.
334. Dickover RE, Garratty EM, Plaeger S, Bryson YJ. Perinatal transmission of major, minor, and multiple maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in utero and intrapartum. *J Virol* 2001;75:2194-203.

335. Verhofstede C, Demecheleer E, De Cabooter N, Gaillard P, Mwanyumba F, Claeys P, Chohan V, Mandaliya K, Temmerman M, Plum J. Diversity of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) env sequence after vertical transmission in mother-child pairs infected with HIV-1 subtype A. *J Virol* 2003;77:3050-7.
336. Kampinga GA, Simonon A, Van de Perre P, Karita E, Msellati P, Goudsmit J. Primary infections with HIV-1 of women and their offspring in Rwanda: findings of heterogeneity at seroconversion, coinfection, and recombinants of HIV-1 subtypes A and C. *Virology* 1997;227:63-76.
337. Long EM, Martin HL, Jr., Kreiss JK, Rainwater SM, Lavreys L, Jackson DJ, Rakwar J, Mandaliya K, Overbaugh J. Gender differences in HIV-1 diversity at time of infection. *Nat Med* 2000;6:71-5.
338. Sagar M, Lavreys L, Baeten JM, Richardson BA, Mandaliya K, Chohan BH, Kreiss JK, Overbaugh J. Infection with multiple human immunodeficiency virus type 1 variants is associated with faster disease progression. *J Virol* 2003;77:12921-6.
339. Learn GH, Muthui D, Brodie SJ, Zhu T, Diem K, Mullins JI, Corey L. Virus population homogenization following acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2002;76:11953-9.
340. Haaland RE, Hawkins PA, Salazar-Gonzalez J, Johnson A, Tichacek A, Karita E, Manigart O, Mulenga J, Keele BF, Shaw GM, Hahn BH, Allen SA, Derdeyn CA, Hunter E. Inflammatory genital infections mitigate a severe genetic bottleneck in heterosexual transmission of subtype A and C HIV-1. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000274.

341. Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993;118:681-8.
342. Diaz RS, Sabino EC, Mayer A, deOliveira CF, Mosley JW, Busch MP. Lack of dual HIV infection in a transfusion recipient exposed to two seropositive blood components. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12:1291-5.
343. Goodenow M, Huet T, Saurin W, Kwok S, Sninsky J, Wain-Hobson S. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1989;2:344-52.
344. Strunnikova N, Ray SC, Lancioni C, Nguyen M, Viscidi RP. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 in relation to disease progression in children. *J Hum Virol* 1998;1:224-39.
345. Strunnikova N, Ray SC, Livingston RA, Rubalcaba E, Viscidi RP. Convergent evolution within the V3 loop domain of human immunodeficiency virus type 1 in association with disease progression. *J Virol* 1995;69:7548-58.
346. Bagnarelli P, Mazzola F, Menzo S, Montroni M, Butini L, Clementi M. Host-specific modulation of the selective constraints driving human immunodeficiency virus type 1 env gene evolution. *J Virol* 1999;73:3764-77.
347. Ganeshan S, Dickover RE, Korber BT, Bryson YJ, Wolinsky SM. Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. *J Virol* 1997;71:663-77.

348. Greenier JL, Van Rompay KK, Montefiori D, Earl P, Moss B, Marthas ML. Simian immunodeficiency virus (SIV) envelope quasispecies transmission and evolution in infant rhesus macaques after oral challenge with uncloned SIVmac251: increased diversity is associated with neutralizing antibodies and improved survival in previously immunized animals. *Virology* 2005;2:11.
349. Masciotra S, Owen SM, Rudolph D, Yang C, Wang B, Saksena N, Spira T, Dhawan S, Lal RB. Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage replication, and coreceptor adaptation during HIV-1 disease progression. *Aids* 2002;16:1887-98.
350. Bello G, Casado C, Garcia S, Rodriguez C, del Romero J, Borderia AV, Lopez-Galindez C. Plasma RNA viral load is not associated with inpatient quasispecies heterogeneity in HIV-1 infection. *Arch Virol* 2004;149:1761-71.
351. Bernardin F, Herring BL, Peddada L, Delwart EL. Primary infection of a male plasma donor with divergent HIV variants from the same source followed by rapid fluctuations in their relative frequency and viral recombination. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:1009-15.
352. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995;267:483-9.
353. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373:117-22.

354. Delwart E, Magierowska M, Royz M, Foley B, Peddada L, Smith R, Heldebrant C, Conrad A, Busch M. Homogeneous quasispecies in 16 out of 17 individuals during very early HIV-1 primary infection. *AIDS* 2002;16:189-95.
355. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986;45:637-48.
356. 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;80:9586-98.
357. Routy JP, Machouf N, Edwardes MD, Brenner BG, Thomas R, Trottier B, Rouleau D, Tremblay CL, Cote P, Baril JG, Remis RS, Sekaly RP, Wainberg MA. Factors associated with a decrease in the prevalence of drug resistance in newly HIV-1 infected individuals in Montreal. *AIDS* 2004;18:2305-12.
358. Ndongala ML, Peretz Y, Boulet S, Doroudchi M, Yassine-Diab B, Boulassel MR, Rouleau D, Tremblay C, Leblanc R, Routy JP, Sekaly RP, Bernard NF. HIV Gag p24 specific responses secreting IFN-gamma and/or IL-2 in treatment-naive individuals in acute infection early disease (AIED) are associated with low viral load. *Clin Immunol* 2009.
359. Tremblay CL, Giguel F, Merrill DP, Wong JT, Rosenberg E, Kalams S, Walker BD, D'Aquila RT, Hirsch MS. Marked differences in quantity of infectious human

- immunodeficiency virus type 1 detected in persons with controlled plasma viremia by a simple enhanced culture method. *J Clin Microbiol* 2000;38:4246-8.
360. Brenner BG, Roger M, Moisi DD, Oliveira M, Hardy I, Turgel R, Charest H, Routy JP, Wainberg MA. Transmission networks of drug resistance acquired in primary/early stage HIV infection. *AIDS* 2008;22:2509-15.
361. Jones NA, Wei X, Flower DR, Wong M, Michor F, Saag MS, Hahn BH, Nowak MA, Shaw GM, Borrow P. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 2004;200:1243-56.
362. Mani I, Gilbert P, Sankale JL, Eisen G, Mboup S, Kanki PJ. Inpatient diversity and its correlation with viral setpoint in human immunodeficiency virus type 1 CRF02_A/G-IbNG infection. *J Virol* 2002;76:10745-55.
363. Jensen MA, Coetzer M, van 't Wout AB, Morris L, Mullins JI. A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol* 2006;80:4698-704.
364. Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI. 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;77:13376-88.
365. Brumme ZL, Dong WW, Yip B, Wynhoven B, Hoffman NG, Swanstrom R, Jensen MA, Mullins JI, Hogg RS, Montaner JS, Harrigan PR. Clinical and immunological impact of HIV envelope V3 sequence variation after starting initial triple antiretroviral therapy. *Aids* 2004;18:F1-9.

366. Cheng-Mayer C, Brown A, Harouse J, Luciw PA, Mayer AJ. Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIVSF33A variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. *J Virol* 1999;73:5294-300.
367. Bangsberg DR, Perry S, Charlebois ED, Clark RA, Roberston M, Zolopa AR, Moss A. Non-adherence to highly active antiretroviral therapy predicts progression to AIDS. *AIDS* 2001;15:1181-3.
368. Hogg RS, Heath K, Bangsberg D, Yip B, Press N, O'Shaughnessy MV, Montaner JS. Intermittent use of triple-combination therapy is predictive of mortality at baseline and after 1 year of follow-up. *AIDS* 2002;16:1051-8.
369. Paterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis EN, Squier C, Wagener MM, Singh N. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Ann Intern Med* 2000;133:21-30.
370. Emery S, Neuhaus JA, Phillips AN, Babiker A, Cohen CJ, Gatell JM, Girard PM, Grund B, Law M, Losso MH, Palfreeman A, Wood R. Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naive participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J Infect Dis* 2008;197:1133-44.
371. Granich RM, Gilks CF, Dye C, De Cock KM, Williams BG. Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV transmission: a mathematical model. *Lancet* 2009;373:48-57.
372. Lima VD, Johnston K, Hogg RS, Levy AR, Harrigan PR, Anema A, Montaner JS. Expanded access to highly active antiretroviral therapy: a potentially powerful strategy to curb the growth of the HIV epidemic. *J Infect Dis* 2008;198:59-67.

373. Lundgren JD, Babiker A, El-Sadr W, Emery S, Grund B, Neaton JD, Neuhaus J, Phillips AN. Inferior clinical outcome of the CD4+ cell count-guided antiretroviral treatment interruption strategy in the SMART study: role of CD4+ Cell counts and HIV RNA levels during follow-up. *J Infect Dis* 2008;197:1145-55.
374. Montaner JS, Hogg R, Wood E, Kerr T, Tyndall M, Levy AR, Harrigan PR. The case for expanding access to highly active antiretroviral therapy to curb the growth of the HIV epidemic. *Lancet* 2006;368:531-6.
375. Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, Kempf DJ, Mellors JW, Coffin JM, King MS. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3879-84.
376. Bailey JR, Sedaghat AR, Kieffer T, Brennan T, Lee PK, Wind-Rotolo M, Haggerty CM, Kamireddi AR, Liu Y, Lee J, Persaud D, Gallant JE, Cofrancesco J, Jr., Quinn TC, Wilke CO, Ray SC, Siliciano JD, Nettles RE, Siliciano RF. Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells. *J Virol* 2006;80:6441-57.
377. Bello G, Casado C, Sandonis V, Alonso-Nieto M, Vicario JL, Garcia S, Hernando V, Rodriguez C, del Romero J, Lopez-Galindez C. A subset of human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors is characterized by the unique presence of ancestral sequences in the viral population. *J Gen Virol* 2005;86:355-64.

378. Markham RB, Wang WC, Weisstein AE, Wang Z, Munoz A, Templeton A, Margolick J, Vlahov D, Quinn T, Farzadegan H, Yu XF. Patterns of HIV-1 evolution in individuals with differing rates of CD4 T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:12568-73.
379. Bernardin F, Kong D, Peddada L, Baxter-Lowe LA, Delwart E. Human immunodeficiency virus mutations during the first month of infection are preferentially found in known cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J Virol* 2005;79:11523-8.
380. Herbeck JT, Nickle DC, Learn GH, Gottlieb GS, Curlin ME, Heath L, Mullins JI. Human immunodeficiency virus type 1 env evolves toward ancestral states upon transmission to a new host. *J Virol* 2006;80:1637-44.
381. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005;437:376-80.
382. Burr T, Hyman JM, Myers G. The origin of acquired immune deficiency syndrome: Darwinian or Lamarckian? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:877-87.

383. Derache A, Maiga AI, Traore O, Akonde A, Cisse M, Jarrousse B, Koita V, Diarra B, Carcelain G, Barin F, Pizzocolo C, Pizarro L, Katlama C, Calvez V, Marcelin AG. Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:456-63.
384. Derache A, Traore O, Koita V, Sylla A, Tubiana R, Simon A, Canestri A, Carcelain G, Katlama C, Calvez V, Cisse M, Marcelin AG. Genetic diversity and drug resistance mutations in HIV type 1 from untreated patients in Bamako, Mali. *Antivir Ther* 2007;12:123-9.
385. Nyombi BM, Kristiansen KI, Bjune G, Muller F, Holm-Hansen C. Diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:761-9.
386. Pillay V, Ledwaba J, Hunt G, Rakgotho M, Singh B, Makubalo L, Bennett DE, Puren A, Morris L. Antiretroviral drug resistance surveillance among drug-naive HIV-1-infected individuals in Gauteng Province, South Africa in 2002 and 2004. *Antivir Ther* 2008;13 Suppl 2:101-7.
387. Nyombi BM, Holm-Hansen C, Kristiansen KI, Bjune G, Muller F. Prevalence of reverse transcriptase and protease mutations associated with antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1 infected pregnant women in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania. *AIDS Res Ther* 2008;5:13.
388. Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Mwamba JK, Tshimpaka J, Kashi M, Mama N, Valea D, Delaporte E, Lepira F, Peeters M. HIV type 1 pol gene diversity and

- antiretroviral drug resistance mutations in the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:202-6.
389. Toni TD, Recordon-Pinson P, Minga A, Ekouevi D, Bonard D, Bequet L, Huet C, Chenal H, Rouet F, Dabis F, Lafon ME, Salamon R, Masquelier B, Fleury HJ. Presence of key drug resistance mutations in isolates from untreated patients of Abidjan, Cote d'Ivoire: ANRS 1257 study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:713-7.
390. Geretti AM, Smith M, Watson C, Mullen J, Osner N, O'Shea S, Chrystie I, Zuckerman M, Easterbrook P. Primary antiretroviral resistance in newly diagnosed patients with established heterosexually acquired HIV-1. *AIDS* 2002;16:2358-60.
391. Jayaraman GC, Gleeson T, Rekart ML, Cook D, Preiksaitis J, Sidaway F, Harmen S, Dawood M, Wood M, Ratnam S, Sandstrom P, Archibald C. Prevalence and determinants of HIV-1 subtypes in Canada: enhancing routinely collected information through the Canadian HIV Strain and Drug Resistance Surveillance Program. *Can Commun Dis Rep* 2003;29:29-36.
392. Routy J-P, dBEM, Rouleau D. et al. Influence of patient characteristics, year of infection, CD4 cell count and viral load on the presence of primary HIV-1 drug resistance in recently infected patients. *Antivir Ther* 2005;10: S133.
393. Vercauteren J, Derdelinckx I, Sasse A, Bogaert M, Ceunen H, De Roo A, De Wit S, Deforche K, Echahidi F, Franssen K, Goffard JC, Goubau P, Goudeseune E, Yombi JC, Lacor P, Liesnard C, Moutschen M, Pierard D, Rens R, Schrooten Y, Vaira D, van den Heuvel A, van der Gucht B, van Ranst M, van Wijngaerden E, Vandercam B, Vekemans M, Verhofstede C, Clumeck N, Vandamme AM, van Laethem K.

- Prevalence and epidemiology of HIV type 1 drug resistance among newly diagnosed therapy-naive patients in Belgium from 2003 to 2006. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:355-62.
394. Garrido C, Zahonero N, Fernandes D, Serrano D, Silva AR, Ferraria N, Antunes F, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V, de Mendoza C. Subtype variability, virological response and drug resistance assessed on dried blood spots collected from HIV patients on antiretroviral therapy in Angola. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:694-8.
395. Ivers LC, Kendrick D, Doucette K. Efficacy of antiretroviral therapy programs in resource-poor settings: a meta-analysis of the published literature. *Clin Infect Dis* 2005;41:217-24.
396. Sungkanuparph S, Groger RK, Overton ET, Fraser VJ, Powderly WG. Persistent low-level viraemia and virological failure in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 2006;7:437-41.
397. Nadembega WM, Giannella S, Simporé J, Ceccherini-Silberstein F, Pietra V, Bertoli A, Pignatelli S, Bellocchi MC, Nikiema JB, Cappelli G, Bere A, Colizzi V, Perno CP, Musumeci S. Characterization of drug-resistance mutations in HIV-1 isolates from non-HAART and HAART treated patients in Burkina Faso. *J Med Virol* 2006;78:1385-91.
398. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Telenti A, Richman DD. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2005. *Top HIV Med* 2005;13:125-31.

399. Cozzi-Lepri A, Ruiz L, Loveday C, Phillips AN, Clotet B, Reiss P, Ledergerber B, Holkmann C, Staszewski S, Lundgren JD. Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. *Antivir Ther* 2005;10:791-802.
400. Flandre P, Descamps D, Joly V, Meiffredy V, Tamalet C, Izopet J, Aboulker JP, Brun-Vezinet F. Predictive factors and selection of thymidine analogue mutations by nucleoside reverse transcriptase inhibitors according to initial regimen received. *Antivir Ther* 2003;8:65-72.
401. 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. 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* 1999;354:795-802.
402. Marseille E, Kahn JG, Mmiro F, Guay L, Musoke P, Fowler MG, Jackson JB. Cost effectiveness of single-dose nevirapine regimen for mothers and babies to decrease vertical HIV-1 transmission in sub-Saharan Africa. *Lancet* 1999;354:803-9.
403. Moodley D, Moodley J, Coovadia H, Gray G, McIntyre J, Hofmyer J, Nikodem C, Hall D, Gigliotti M, Robinson P, Boshoff L, Sullivan JL. A multicenter randomized controlled trial of nevirapine versus a combination of zidovudine and lamivudine to reduce intrapartum and early postpartum mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2003;187:725-35.

404. Laurent C, Kouanfack C, Koulla-Shiro S, Nkoue N, Bourgeois A, Calmy A, Lactuock B, Nzeusseu V, Mougnotou R, Peytavin G, Liegeois F, Nerrienet E, Tardy M, Peeters M, Andrieux-Meyer I, Zekeng L, Kazatchkine M, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E. Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1-infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. *Lancet* 2004;364:29-34.

