

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Étude de l'immunité maternelle et de la diversité
génétique du virus de l'immunodéficience humaine de
type I (VIH-1) durant la grossesse**

par

Bertine Sandra Akouamba

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

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

Avril, 2008



© Bertine Sandra Akouamba, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude de l'immunité maternelle et de la diversité génétique du virus de l'immunodéficience
humaine de type 1 (VIH-1) durant la grossesse

présentée par :

Bertine Sandra Akouamba

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Patrick Hallenbeck, président-rapporteur

Hugo Soudeyns, directeur de recherche

Danielle Rouleau, examinatrice interne

Jean-Pierre Routy, examinateur externe

Léa Brakier-Gingras, représentant du doyen de la FES



membre du jury

Résumé

La transmission mère-enfant du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) constitue un aspect d'intérêt grandissant de la pandémie du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Les objectifs de ce travail qui porte sur les femmes enceintes sont : a) étudier la diversité génétique du VIH-1; b) caractériser les réponses LTC VIH-spécifiques; c) analyser l'évolution génétique du VIH; et d) évaluer l'effet de la thérapie antirétrovirale sur les réponses LTC anti-VIH et la dynamique des populations virales VIH.

Notre étude sur la diversité génétique du VIH-1 a montré que 42,7% des patientes étaient infectées par des virus de sous types non-B du VIH-1. Nous avons trouvé un total de 97,7% de virus non-B chez les femmes d'origine africaine, et dans tous les cas, l'identité des sous types correspondait aux clades circulant dans les pays d'origine de ces patientes. Enfin, nous avons démontré que les dates d'introduction des clades non-B dans notre cohorte correspondaient avec l'arrivée des réfugiées en provenance des régions endémiques d'Afrique.

Nous avons ensuite fait une caractérisation longitudinale de la réponse LTC VIH-spécifique et évalué la modulation de cette immunité par la thérapie antirétrovirale chez la femme enceinte. Tout d'abord, nous avons clairement établi une association entre l'augmentation progressive de la prévalence des réponses LTC VIH-spécifiques et la progression de la maladie. La prophylaxie antirétrovirale induit le déclin de l'immunité cellulaire VIH-spécifique. Nous n'avons noté aucune différence significative entre le premier, second et troisième trimestre de grossesse ou entre les grossesses consécutives. Par contre, nous avons déterminé que les protéines virales Gag, Env, Pol et gp120 étaient préférentiellement ciblées par les réponses LTC. Enfin, nous avons révélé une corrélation entre l'étendu des variations dans la hiérarchie de la reconnaissance antigénique entre les grossesses consécutives et la durée de l'intervalle intergénéral.

Finalement, notre étude consacrée à la diversité génétique du gène *env* du VIH-1 a mis en évidence l'existence d'une dynamique au niveau des quasiespèces VIH durant la grossesse et l'intervalle intergénésiq. L'évolution des populations virales est plus marquée quand la réplication virale est contenue. Nous avons pu établir une corrélation entre le degré de diversification de la région V3 et la durée de la période intergénésiq. Nous avons aussi observé une réduction de la diversité génétique des régions V1, V2, et V3 de Env au troisième trimestre de grossesse, et la thérapie antirétrovirale semble augmenter cette diversité durant toute la grossesse. Enfin, nos ratios dN/dS suggèrent que la boucle V2 est plus ciblée par le système immunitaire et soulignent l'importance d'inclure cette région dans les études de la diversité génétique du VIH-1.

Nos résultats apportent des éléments d'évidences supplémentaires en faveur d'une absence de dysfonctionnement sévère de l'immunité cellulaire durant la grossesse. Ainsi, notre étude fournit des arguments scientifiques additionnels soutenant le développement d'une prophylaxie active et/ou des stratégies d'immunisation préventives permettant de renforcer le contrôle de la transmission mère-enfant du VIH.

Mots-clés : VIH, grossesse, sous-types, enveloppe, diversité génétique, lymphocytes T CD8⁺, TAR.

Abstract

Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has become one of the fastest growing aspects of the AIDS pandemic. The objectives of this work based on pregnant women are: a) to study HIV-1 genetic diversity; b) to characterize HIV-specific CTL responses; c) To analyze the genetic evolution of HIV strains; and d) to assess the impact of antiretroviral therapy on both CTL responses and HIV viral population.

Our study of HIV genetic diversity has shown that 42.7% of patients were infected with non-clade B viruses. A total of 97.7% of non-clade B viruses were found in African women and, in all cases, clade identity was consistent with variants circulating in patient's countries of origin. We successfully demonstrated that dates of arrival into Canada of patients infected with nonclade B HIV correspond with the migration of refugees from African HIV-endemic areas.

We then made a longitudinal characterization of HIV-specific CTL effectors responses and assessed the modulation of this arm of cellular immunity by antiretroviral therapy in HIV infected women. First, we clearly established that HIV-specific CTL responses become progressively more prevalent as HIV disease progresses. ART treatment was associated with a decline in CTL responses. No significant variations were observed between first, second, and third trimesters, or between consecutive pregnancies. Then, we found strongest CTL responses against Gag, Env, Pol and gp120. Finally, the extent of variation in the hierarchy of antigenic recognition observed between consecutive pregnancies was correlated with the duration of the inter-pregnancy interval.

Finally, our assessment of the diversity of *env* gene showed a longitudinal evolution of HIV viral populations throughout pregnancy and across the intre-pregnancy interval, and this evolution seemed more important when viral replication is controlled. The longer inter-pregnancy intervals were associated with largest magnitude of Env V3 domain diversification. We also found lowest diversity at the third trimester for all Env domains

studied and ART treatment increased this diversity in all stage of pregnancy. Finally, our dN/dS ratio suggested that *env* V2 domain is more targeted by the immune selective pressure and underlined the importance to include this domain in any HIV-1 genetic diversity investigations.

Our results bring further support to the theory that there is no severe dysfunction of HIV-specific CTL during pregnancy and add to the scientific rational for the development of active and prophylactic and/or preventive immunization strategies for prevention of mother-to-child HIV-1 transmission.

Keywords: HIV, pregnancy, subtypes, envelope, genetic diversity, CD8⁺ T lymphocytes, ART

Table des matières

Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	xi
1. Introduction.....	1
1.1 Mise en contexte	2
1.2. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).....	3
1.2.1. Historique.....	3
1.2.2. Épidémiologie et transmission	4
1.2.3. Structure du virus	5
1.2.4. Cycle de réplication.....	10
1.2.5. Évolution naturelle de l'infection par le VIH	12
1.2.6. Tropisme et Pathogenèse.....	14
1.3. Thérapie antirétrovirale.....	15
1.3.1. Mécanismes d'action des agents antirétroviraux	15
1.3.2. Principales limites de la prophylaxie antirétrovirale.....	21
1.4. Diversité génétique du VIH-1	21
1.4.1. Origine	21
1.4.2. Classification.....	22
1.4.3. Méthodes d'identification	26
1.4.4. Répartition géographique	26
1.4.5. Mouvement des populations et expansion des clades	29
1.4.5. Mouvement des populations et expansion des clades	29
1.4.6. Impact de la diversité des clades	30
1.6. Transmission mère-enfant du VIH-1	33
1.6.1. Prévalence de l'infection par le VIH chez les femmes	33
1.6.2. Taux de transmission du VIH de la mère à l'enfant.....	33
1.6.3. Mécanismes de transmission.....	34

1.6.4. Facteurs qui influencent la transmission mère-enfant du VIH-1	39
1.7. Moyens de préventions	44
1.7.1. Agents antirétroviraux.....	44
1.7.2. Limites de la thérapie antirétrovirale	45
1.7.3. Nouvelles stratégies	49
1.7.4. Autres moyens de prévention.....	52
1.8. Lymphocytes T cytotoxiques	53
1.8.1. Mécanisme d'action	53
1.8.2. Facteurs affectant l'activité des LTC chez les personnes infectées par le VIH	54
1.8.3. Rôle dans le contrôle de la réplication virale	57
1.8.4. Implication dans la transmission mère-enfant du VIH-1	59
1.8.5. Effet de la prophylaxie antirétrovirale	61
1.9. Objectifs	62
1.9.1. Article 1	62
1.9.2. Article 2.....	63
1.9.3. Article 3.....	64
1.10. Contribution personnelle aux différents articles	64
1.10.1. Article 1.....	64
1.10.2. Article 2.....	65
1.10.3. Article 3.....	65
Article 1	66
Article 2.....	72
Article 3.....	110
Conclusion générale.....	159

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Tableau 1. Liste des inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH-1.....	18
Tableau 2. Liste des inhibiteurs de la protéase du VIH-1.....	19
Tableau 3. Liste des inhibiteurs de l'entrée du VIH dans la cellule hôte.....	20

ARTICLE 1.

Tableau 1. Viral and Immune parameters in study participants.....	70
--	----

ARTICLE 2.

Tableau 1. Clinical characteristics of study group.....	101
--	-----

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1.1 A et B. Représentation de la structure du Virion et de la Gp120.....	8
Figure 1.1 C. Organisation génétique du VIH-1.....	9
Figure 1.2. Cycle de réplication du VIH-1.....	11
Figure 1.3. Profil sérologique de l'infection par le VIH.....	13
Figure 1.4. Mécanismes d'action des agents antirétroviraux.....	16
Figure 1.5. Arbre phylogénétique représentant les différents groupes et sous types du VIH-1.....	24
Figure 1.6. Illustration de la structure mosaïque des génomes de certaines des formes recombinantes du VIH-1.....	25
Figure 1.7. Distribution géographique des formes génétiques du VIH-1.....	28
Figure 1.8. Mécanisme de transmission du VIH <i>in utero</i>	37

ARTICLE 1.

Figure 1. Phylogenetic analysis of pol sequences derived from pregnant women infected with HIV-1.....	69
--	----

ARTICLE 2.

Figure 1. Clinical parameters in study participants.....	103
Figure 2. HIV-specific CTL precursor frequencies in study participants.....	105
Figure 3. HIV antigenic specificity of T cell microcultures derived from study participants.....	107

Figure 4. Hierarchy of HIV-1 antigen recognition by T cell microcultures derived from study participants.....	109
--	-----

ARTICLE 3

Figure1. Phylogenetic analysis of HIV <i>env</i> sequences during pregnancy and inert-pregnancy intervals.....	137
Figure 2. Analysis of HIV-1 viruses in study participants.....	140
Figure.3. Analysis of HIV-1 viruses diversity throughout the pregnancy in study group.....	143
Figure 4. Analysis of dN/dS ratio in HIV-1 Env variants in study group.....	145

DISCUSSION

Figure supplémentaire 1. Analyse phylogénétique des séquences pol des patientes infectées par les virus VIH-1 de sous type B.....	150
Figure supplémentaire 2. Arrivée des patientes originaires d'Afrique et émergences des virus de clade non-B.....	151

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARV	«aids-associated retrovirus»
AZT	zidovudine
CMIS	centre maternel et infantile sur le sida
CD45R	antigène leucocytaire
CD95	antigène Fas
CHU	centre hospitalier universitaire
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	«cytomégalo virus»
ConA	concanavaline A
CPCMI	Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses
CRF	«circulating recombinant form»
DDI	didanosine
D4T	stavudine
Env	enveloppe
Fas L	«fas ligand»
GAG	nucleocapside
Gp120	glycoprotéine de l'enveloppe 120
HAART	«highly active antiretroviral therapy»
HCG	hormone chorionique gonatropique
HLA	«human leucocyte antigen»
HMA	«heteroduplex mobility assay»
HTLV	«human T-cell lymphotropic virus»
Ig	immunoglobuline
Il	interleukine
IP	inhibiteur de la protéase

INF γ	interferon gamma
LAV	«lymphoadenopathie-associated virus»
LTC	lymphocyte T cytotoxique
LTR	«long terminal repeat»
MIP	«Macrophage inflammatory protein»
NSI	«non syncithium inducing»
NVP	névirapine
OMS	organisation mondiale de la santé
ONUSIDA	Programme commun des Nations Unis sur le VIH/SIDA
PHA	phytohemagglutinine
PIC	«pre-integration complex»
POL	polymérase
SCH-C	schering C
SI	«syncithium inducing»
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
TNF α	«tumor necrosis factor alpha»
3TC	lamivudine
URF	« unic recombinant form»
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VIS	virus de l'immunodéficience simien

*Aux trois hommes de ma vie : mon père Mr.
Oyougou Alphonse; mon conjoint Mr.
Mbemba Roch Apollinaire; et mon fils
Mbemba Élie Mathis Oyougou*

Remerciements

J'aimerai commencer cette rubrique en remerciant mon directeur de recherche pour m'avoir permis de travailler dans un environnement stimulant et rempli de défis. J'aimerai lui exprimer ma reconnaissance pour le soutien intellectuel, financier, moral et de m'avoir appris à me dépasser.

Un grand merci à ma famille qui a toujours cru en mes capacités intellectuelles et m'a encouragé malgré les 12000 km qui nous séparent. Un merci particulier à ma mère Mme Malevoulou Justine et à ma sœur Sonia pour leur soutien inébranlable. Une grande reconnaissance à ma tante Fabienne dont les coups de fil matinaux m'ont permis de garder le contact avec le reste de la famille. Une pensée particulière pour ma grand-mère Madeleine qui nous a quitté en 2005.

Je voudrai exprimer ma reconnaissance à un homme exceptionnel, Roch mon conjoint, grâce à qui tout cela a été possible. Il a accepté de mettre notre vie de couple entre parenthèse pendant 14 ans pour me permettre de poursuivre d'aussi longues études. Tout cela sans reproches, au contraire avec beaucoup d'amour et de patience. Pour finir il m'a permis d'accomplir ma plus grande réalisation, mon fils Élie Mathis. Une tendre pensée à mon fils qui a adouci la fin de ce doctorat avec ses sourires.

Finalement, j'ai une pensée particulière pour toute l'équipe du laboratoire d'immunopathogénèse virale, en particulier Sophie, Myriam, Émilie, Natacha, pour leur collaboration au travail intellectuel, pour avoir su rendre notre cadre de travail plus agréable et pour cette amitié qui dépasse le cadre du laboratoire. Une pensée particulière pour Martine sur laquelle j'ai toujours compté aux moments où j'avais besoin d'une oreille et pour l'énorme travail qu'elle a accompli dans ce laboratoire.

1. Introduction

1.1 Mise en contexte

L'épidémie du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), dont l'agent étiologique est le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), constitue un réel problème de santé publique à l'échelle mondiale. Ainsi, ONUSIDA estime à 40.3 millions le nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH ou le SIDA dans le monde, dont 25.8 millions résident en Afrique Sub-Saharienne. Selon la même estimation, 700,000 enfants de moins de 15 ans, dont 630,000 en Afrique Sub-Saharienne, ont été infectés au cours de l'année 2005.

La transmission du VIH se fait essentiellement par la voie sexuelle, sanguine et maternofoetale. Il est clairement établi que la transmission mère-enfant du VIH est la principale voie de contamination chez les enfants. Cette dernière peut être influencée à la fois par des facteurs, virologiques et immunologiques présents chez la mère pendant la grossesse et le travail, facteurs qui seront décrits en détail dans la section 1.6.4. Les résultats de nos travaux sur les populations virales seront présentés dans les articles constituant les chapitres I et III.

L'utilisation de la thérapie antirétrovirale, qui a amélioré l'espérance de vie des adultes et des enfants infectés par le VIH dans les pays développés, a également permis de réduire considérablement le taux de transmission du VIH de la mère à l'enfant. Cependant, l'apparition des souches résistantes aux agents antirétroviraux et le nombre croissant de cas d'infections d'enfants nés de mères traitées soulignent la nécessité de développer de nouvelles stratégies prophylactiques de prévention. Cela dit, la capacité de renforcer la prévention de la transmission mère-enfant du VIH requiert une meilleure connaissance de l'immunité VIH-spécifique de la mère durant la grossesse. L'implication des lymphocytes T cytotoxiques dans le contrôle de la réplication virale et la transmission du VIH à l'enfant seront décrits longuement dans les sections 1.8.3 et 1.8.4. Notre contribution à l'étude de l'immunité maternelle durant la grossesse sera présentée dans l'article constituant le chapitre II.

L'objectif de mon projet de recherche était de caractériser à la fois la diversité génétique et la dynamique des populations virales du VIH-1, l'activité des lymphocytes T cytotoxiques VIH-spécifiques et l'impact de la thérapie sur cette immunité durant la grossesse.

1.2. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

1.2.1. Historique

En 1981, les cliniciens de New York et de la Californie ont rapporté une incidence inhabituelle de cas de sarcome de Kaposi, une tumeur de la peau extrêmement rare, chez un groupe de patients constitué de jeunes hommes homosexuels (Gottlieb et al. 1981; Siegal et al. 1981). Certains d'entre eux, présentaient également une pneumonie causée par le pathogène fongique *Pneumocystis carinii* ainsi que d'autres infections opportunistes rares. La même année, les équipes de Gottlieb et Masur établirent que ces personnes souffraient d'un important déficit au niveau de l'immunité à médiation cellulaire, résultant d'une diminution significative du nombre de cellules T CD4⁺ auxiliaires (Gottlieb et al. 1981; Masur et al. 1981). L'idée initiale que le syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA) était lié aux habitudes spécifiques aux hommes homosexuels fut rapidement abandonnée après l'observation du syndrome chez des groupes distinctement différents aux Etats-Unis comme les hémophiles (Stehr-Green et al. 1988), les personnes transplantées (Atkinson et al. 1987; Dummer et al. 1989), les utilisateurs de drogues injectables (Stoneburner et al. 1988), les immigrants Haïtiens et les partenaires sexuels des personnes à hauts risques (Centers for Disease Control, 1983). L'immunopathogenèse du SIDA et la meilleure connaissance des rétrovirus permirent de suggérer que cette nouvelle maladie avait une étiologie rétrovirale. L'intérêt des scientifiques fut d'abord porté sur le virus HTLV-I (human T-cell lymphotropic virus I), dont le profil de transmission ressemblait à celui observé chez les personnes atteintes du SIDA, et qui avait un tropisme préférentiel pour les

cellules T CD4⁺, et provoquait des déficiences immunitaires humaines et animales (Varmus 1988). Dès 1983, l'isolement du virus HTLV-1 chez les patients atteints de lymphoadénopathie permit au groupe de Luc Montagnier, de l'Institut Pasteur en France, d'établir l'association entre le SIDA et un rétrovirus qu'ils appèlerent LAV pour lymphoadenopathie-associated virus (Barre-Sinoussi et al. 1983). La même année, les anticorps anti-HTLV-1 furent détectés chez les malades du SIDA (Essex et al. 1983). Finalement, c'est en 1984 qu'un groupe français et les chercheurs du National Institutes of Health, dirigés par Robert C. Gallo, établissaient sur la base d'évidences virologiques et épidémiologiques que le HTLV-III (human T-cell lymphotropic virus III), un rétrovirus qu'ils avaient isolé des échantillons obtenus du laboratoire de Montagnier, était l'agent étiologique du SIDA (Popovic et al. 1984; Sarngadharan et al. 1984; Safai et al. 1984). En même temps, Levy et ses associés isolaient un rétrovirus similaire qu'ils nomèrent ARV (AIDS-associated retrovirus) (Levy et al. 1984). Ce nouveau retrovirus fut plus tard baptisé HIV pour human immunodeficiency virus (Coffin et al. 1986).

1.2.2. Épidémiologie et transmission

La pandémie des infections au VIH, à l'origine du SIDA, est sans aucun doute le problème médical et de santé publique, de notre génération, que l'on peut classer parmi les plus grands fléaux de l'histoire (Fauci 1999). Depuis la découverte des premiers cas en 1981, la maladie s'est répandue, et, en 2005 ONUSIDA estimait à 40 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH ou le SIDA dans le monde, dont 2,3 millions d'enfants (ONUSIDA 2005). 4,9 millions d'individus ont contracté une infection par le VIH et quelques 3,1 millions ont perdu la vie à cause du SIDA. Malheureusement le potentiel catastrophique de cette pandémie n'est pas pleinement atteint, à en juger par la rapide augmentation de la prévalence du VIH en Afrique Sub-Saharienne, où 3,2 millions de personnes ont été infectées en 2005. En effet, l'Afrique reste la région la plus touchée par la propagation du VIH, on y trouve plus de la moitié de toutes les personnes qui vivent avec le virus dans le monde, soit 26,3 millions. L'incidence de l'infection augmente aussi en Asie

du Sud et du Sud Est, où 990,000 personnes ont contracté le VIH cette même année (Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2005). En effet, les plus fortes augmentations d'infections à VIH entre 2002 et 2004 ont été enregistrées en Asie de l'Est (50%), en Europe orientale et en Asie centrale (40%), et en Asie de l'Est (ONUSIDA/OMS 2004). Enfin, selon les données les plus récentes, le nombre de personnes vivant avec le VIH au Canada serait d'environ 58 000, alors qu'il se chiffrait à 50 000 en 2002. Selon les mêmes données, 2 300 à 4 500 nouvelles infections par le VIH ont eu lieu en 2005 (Agence de santé publique du Canada, 2006).

La transmission du VIH se fait essentiellement par voie sexuelle, suite à une exposition au sang ou aux produits sanguins contaminés, ou de la mère à l'enfant (aussi appelée transmission verticale ou maternofoetale) (Selik et al. 1995). Les personnes à haut risque incluent les personnes ayant des partenaires sexuels infectés, les utilisateurs de drogues injectables, les personnes transfusées par les produits sanguins contaminés, et les enfants nés de mères infectées (Center for disease control and Prevention, 1996).

1.2.3. Structure du virus

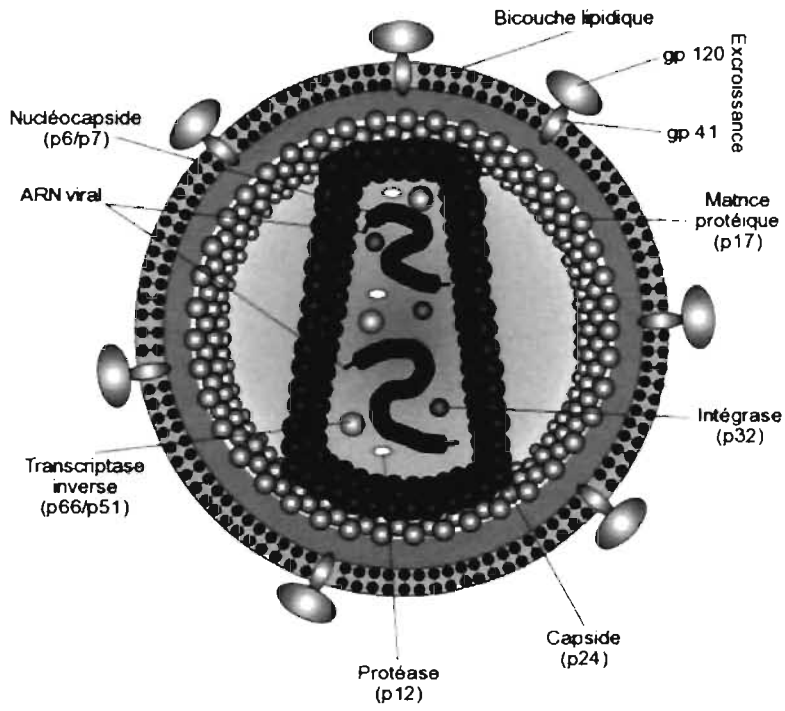
Le VIH, membre de la famille des lentiviridae, est un rétrovirus de 100 à 120 nm de diamètre (Fig. 1-1A) dont le génome est constitué de deux copies d'ARN simple brin associées à deux molécules de transcriptase inverse (p51), à une protéase (p11) et à une intégrase (p31). Chaque virion exprime près de 14 projections glycoprotéiques, glycoprotéines Env, composées d'une sous unité transmembranaire la gp41 et d'une sous unité externe la gp120 (Zhu et al. 2003; 2006). Env qui se présente sous forme de trimères à la surface du virus est un élément essentiel pour l'entrée du virus dans la cellule. En effet, sa liaison aux récepteurs cellulaires CD4 induit une cascade d'évènements qui vont aboutir à l'entrée du virus dans la cellule cible (Dalglish et al. 1984; Landau et al. 1988; Sattentau and Moore 1991; Trkola et al. 1996; Hill et al. 1997; Chan and Kim 1998; Sullivan et al. 1998). La gp120 est formée de neuf régions hautement conservées et cinq régions

hypervariables (Kwong et al. 1998). Les régions hypervariables V1/V2 modulent l'exposition des sites de liaison des corécepteurs (Wyatt et al. 1998), elles contiennent des épitopes pour la réponse anticorps (McKeating et al. 1993) et peuvent contribuer au tropisme cellulaire et à la cytopathie (Palmer et al. 1996). La région V3, quant à elle, renferme les éléments déterminants pour le tropisme cellulaire du VIH (Speck et al. 1997; Cho et al. 1998), elle contient aussi les épitopes ciblés à la fois par les lymphocytes T cytotoxiques (Clerici et al. 1991; Takahashi et al. 1992), les lymphocytes T auxiliaires (Palker et al. 1989; Takahashi et al. 1990) et les anticorps neutralisants (Ho et al. 1987; Javaherian et al. 1990) (Fig.1-1B). La nucléocapside comprend une couche externe, la matrice, constituée de protéines p17 attachées à la couche interne de la bicouche lipidique du virion, elle joue un rôle important dans la stabilité de la particule virale. Sa couche profonde, la capsid, est composée de la protéine p24.

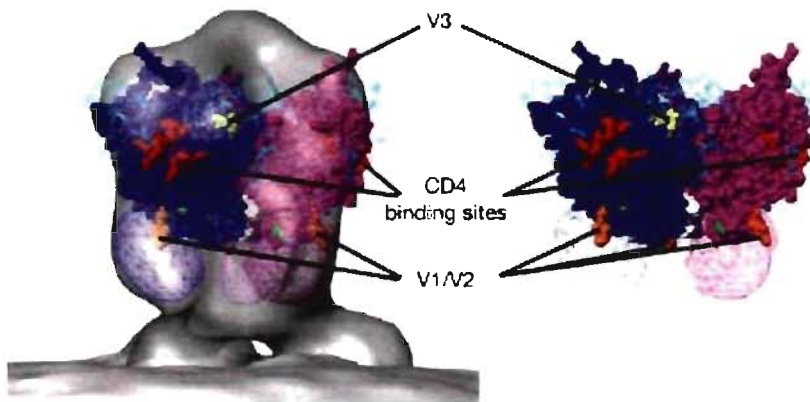
Le génome (Fig. 1-1 C) du VIH comprend trois principaux gènes *gag*, *pol* et *env* qui codent pour les précurseurs polyprotéiques dont le clivage, par la protéase virale, va générer les protéines de la nucléocapside (Gag), les protéines de l'enveloppe (gp120 et gp41) mais aussi les enzymes nécessaires à la réplication comme la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase qui médie l'insertion de l'ADN provirale dans le génome de la cellule infectée (Bushman et al. 1990). Des six gènes restants, trois (*tat*, *rev*, et *nef*) codent des protéines régulatrices: Tat qui est transactivateur transcriptionnel essentiel à la réplication du VIH (Ruben et al. 1989); Rev, une protéine qui se lie de manière séquence-spécifique à l'ARN, dont l'action consiste à induire la transition entre l'expression des gènes de la phase précoce et celle des gènes de la phase tardive (Zapp and Green 1989; Kim et al. 1989); et Nef qui a de multiples fonctions incluant la régulation négative de l'expression des molécules CD4 (Garcia and Miller 1992; Aiken et al. 1994) et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) (Schwartz et al. 1996) à la surface des cellules infectées, la stimulation de l'infectivité des virions du VIH (Miller et al. 1994), et la perturbation de l'activation des cellules T, en réprimant l'expression du facteur de transcription NF-kappa B et de l'Interleukine-2 (IL-2) (Luria et al. 1991). Les trois

autres gènes viraux, *vif*, *vpu* et *vpr* codent, respectivement, les protéines accessoires suivantes: Vif, essentielle à la réplication du VIH dans les lymphocytes et les macrophages du sang périphérique, et certaines lignées cellulaires (Strebel et al. 1987), et qui semble aussi être impliquée dans la synthèse de l'ADN proviral (von Schwedler et al. 1993); Vpu, diminue l'expression du CD4 et augmente la relâche des particules virales (Klimkait et al. 1990; Schubert et al. 1996); et Vpr qui joue un rôle dans la capacité qu'a le VIH d'infecter les cellules qui ne sont pas en division, en facilitant le transport dans le noyau du complexe de préintégration (Heinzinger et al. 1994; Vodicka et al. 1998), elle bloque aussi la division cellulaire en phase G2 du cycle cellulaire (Rogel et al. 1995; Jowett et al. 1995; Re et al. 1995; He et al. 1995).

A



B



c

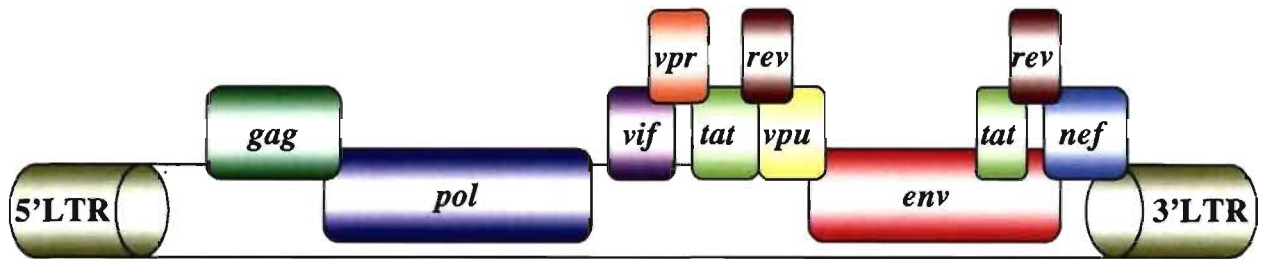


Figure 1.1. Représentation de la structure du virion (A), de la glycoprotéine GP120 tiré de (Zhu et al. 2006) (B), et de l'organisation génétique du VIH-1 (C).

1.2.4. Cycle de réplication

Le cycle de réplication du VIH comprend 2 phases (Fig. 1-2), une précoce et une tardive. Lors de la phase précoce, le virus se fixe sur les récepteurs CD4 des lymphocytes T CD4⁺ et des macrophages via sa glycoprotéine d'enveloppe (gp120). La fusion membranaire qui s'en suit fait intervenir des corécepteurs exprimés à la surface des cellules cibles CXCR4 (ubiquitaire) et CCR5 (macrophages) et provoque l'entrée de la capsid virale dans le cytoplasme cellulaire. L'ARN viral est ensuite transcrit en ADN grâce à la transcriptase inverse. L'ADN nouvellement synthétisé (ou progénome) est envoyé vers le noyau de la cellule lié à un complexe protéique : le PIC ou complexe de pré-intégration qui contient l'intégrase, la protéine matrice, la transcriptase inverse et la Vpr qui joue un rôle dans l'import nucléaire. Le progénome viral est ensuite intégré dans le génome de la cellule hôte, grâce à l'intégrase, il devient le provirus.

La phase tardive du cycle correspond aux étapes permettant d'obtenir des virions complets, capables de bourgeonner et de maturer après leur libération dans le milieu extracellulaire. Cette phase débute par la transcription du provirus. Des ARN courts épissés, codant pour les protéines précoces (Tat, Rev et Nef) sont produits avant les ARN codant pour les protéines tardives (Gag, Pol, Env, Vif et Vpr). Une fois traduits, les différents composants viraux, acheminés à la membrane cellulaire, s'assemblent pour former un virion qui bourgeonne et finit sa maturation dans le milieu extracellulaire grâce à la protéase.

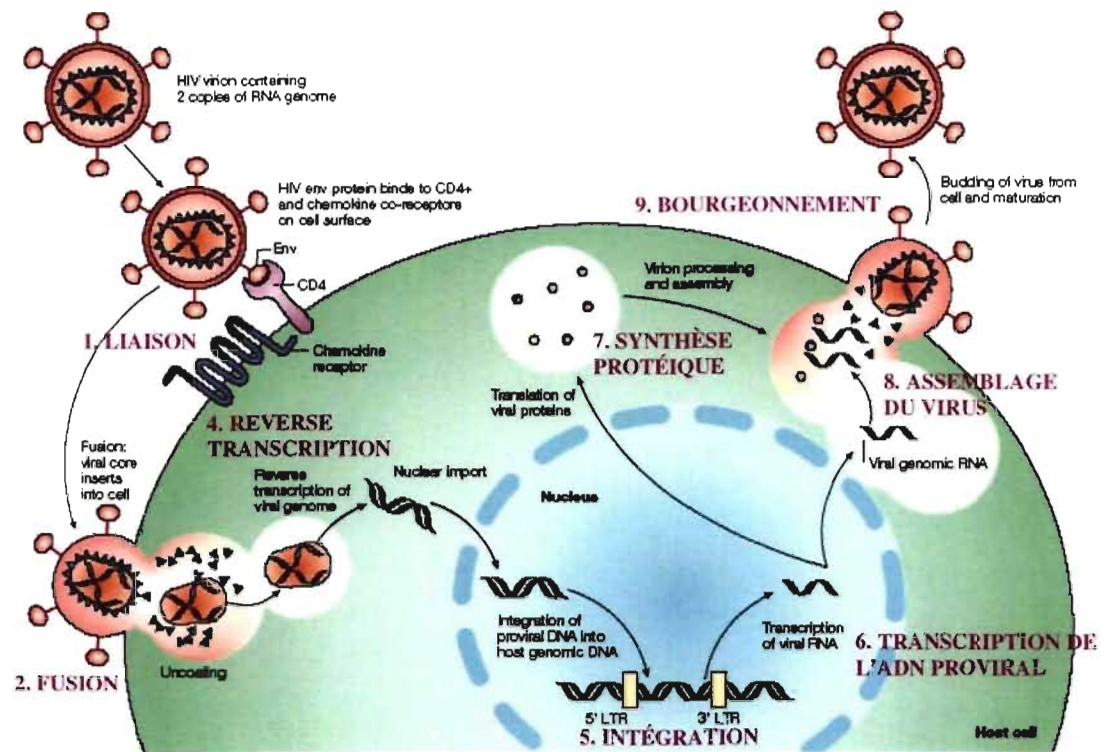


Figure 1-2. Cycle de réplication du VIH-1. La phase précoce de la réplication comprend les étapes 1 à 5; et les étapes 6-9 constituent la phase tardive adapté de (Rambaut et al. 2004).

1.2.5. Évolution naturelle de l'infection par le VIH

L'infection primaire, encore appelée infection aiguë ou primo-infection, se caractérise par des niveaux d'ARN viral plasmatiques très élevés, une déplétion transitoire des cellules T CD4⁺, et une expansion des cellules T CD8⁺ (Fig. 1-3) (Fauci et al. 1996). Quelques mois après l'infection, les anticorps dirigés contre les protéines virales apparaissent, l'individu est dit séroconverti ou séropositif. L'infection primaire peut s'accompagner, chez une minorité de patients, de symptômes tels que fièvre, adénopathies (gonflement des ganglions lymphatiques) et éruptions cutanées. Mais le plus souvent, cette phase n'est pas remarquée et est suivie d'une longue période d'infection chronique au cours de laquelle les personnes infectées montrent peu ou pas de signes d'infection. Près de 70% des personnes infectées développent le SIDA 9 à 10 ans après l'infection. La première manifestation du SIDA peut être une infection opportuniste par le champignon *Candida albicans*, ou une toux sèche et opiniâtre causée par une infection des poumons par *Pneumocystis carinii*. Une élévation de la charge virale et une chute concomitante du nombre de cellules T CD4⁺ (<200 cellules /mm³).

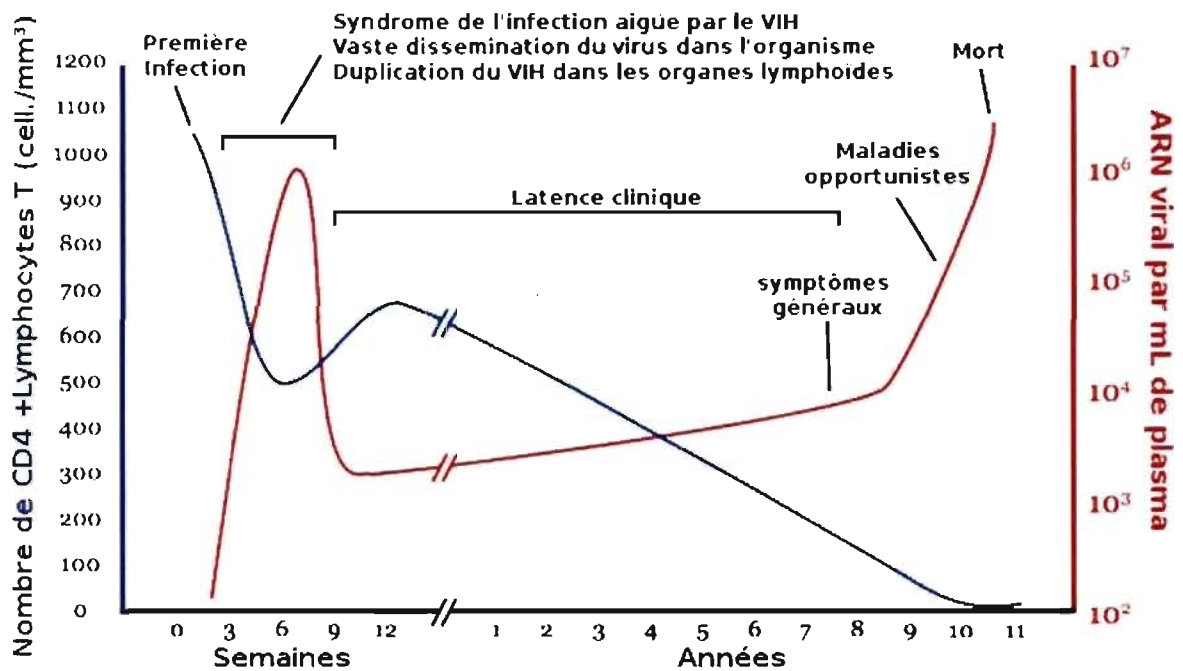


Figure 1-3. Profil sérologique de l'infection par le VIH. Les trois étapes du processus infectieux (Phase aiguë, chronique ou latence clinique et SIDA) sont illustrés, adapté de (Fauci et al. 1996).

1.2.6. Tropisme et Pathogénèse

Le mécanisme central par lequel le VIH induit une déficience immunitaire chez l'hôte est la destruction et/ou la détérioration fonctionnelle des cellules CD4⁺ (Fauci 1988). En effet, la molécule CD4 est le principal récepteur cellulaire du VIH ce qui explique son tropisme pour les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes/macrophages (Dalglish et al. 1984; Maddon et al. 1986). Toutefois, l'entrée du virus dans la cellule cible requiert l'implication d'autres molécules appelées les «co-récepteurs de fusion ». Ainsi, la protéine de surface CXCR4 est le co-récepteur des souches VIH T-tropiques (virus X4) (Feng et al. 1996) alors que CCR5 est utilisé comme co-récepteur par les souches M-tropiques (virus R5) (Alkhatib et al. 1996; Dragic et al. 1996). L'importance du co-récepteur CCR5 dans la pathogénèse du VIH a été prouvée par la découverte que les cellules des personnes homozygotes pour la délétion de 32 paires de base dans le gène *ccr5* ne pouvaient pas être infectés *in vitro* par des virus R5 (O'Brien and Moore 2000). Un certain nombre d'autres co-récepteurs peuvent être utilisés par le VIH *in vitro* (Heveker 2001). Parmi ceux-ci, on retrouve CCR3 (Choe et al. 1996), CCR8 (Rucker et al. 1997), CXCR1 (Combadiere et al. 1998), la protéine US28 du cytomégalovirus (Choe et al. 1996), et les récepteurs orphelins STRL33/Bonzo (Alkhatib et al. 1997) et GPR15/Bob (Edinger et al. 1998). L'importance biologique de ces co-récepteurs alternatifs reste incertaine *in vivo* car, les inhibiteurs d'entrée spécifiques de CCR5 et CXCR4 peuvent totalement inhiber la réplication de plusieurs souches VIH qui ont un large spectre d'utilisation des co-récepteurs (Zhang and Moore 1999).

1.3. Thérapie antirétrovirale

1.3.1. Mécanismes d'action des agents antirétroviraux

Le cycle biologique du VIH présente plusieurs points sensibles qui peuvent être bloqués par les produits pharmaceutiques. Mais ces agents doivent impérativement être spécifiques au VIH et n'interférer que très peu avec les processus cellulaires normaux. Les différents agents antirétroviraux, utilisés actuellement, ciblent l'une des quatre étapes clés de la réplication (Fig. 1-4): l'entrée du virus dans la cellule hôte; la conversion de l'ARN viral en ADN double brin catalysée; l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte; et le clivage des précurseurs viraux par la protéase virale.

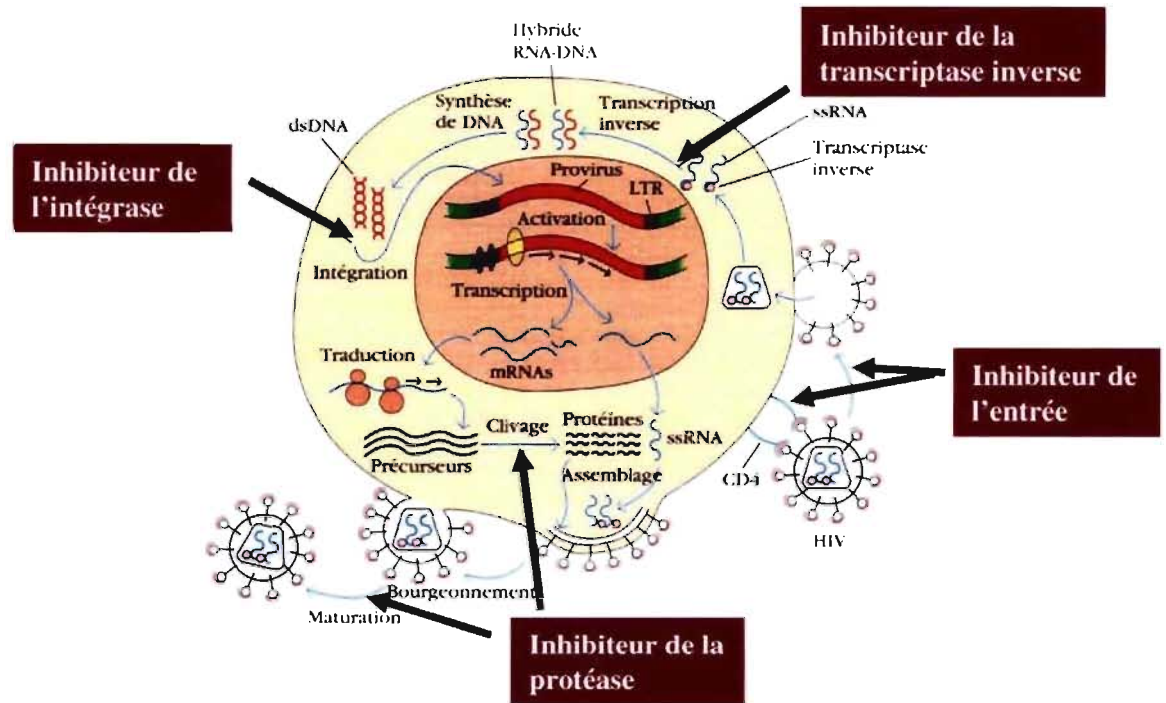


Figure 1-4. Mécanismes d'action des agents antirétroviraux. Étapes du cycle de la réplication virale ciblées par les antirétroviraux (adapté de kuby et al., 2002).

1.3.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

L'activité de la transcriptase inverse est ciblée par les inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques. La structure des inhibiteurs nucléosidiques imite celle des nucléosides naturels (thymidine, uridine, cytidine, adénisine et guanosine) contenus dans les molécules d'ADN et d'ARN. Les enzymes de la cellule hôte catalysent leur phosphorylation et génèrent les composés triphosphatés actifs qui vont entrer en compétition avec les nucléosides naturels pour le site actif de la transcriptase inverse. Ce qui va aboutir à l'inhibition de l'élongation de la synthèse de l'ADN provirale et bloquer la réplication du virus (Tableau 1).

1.3.1.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

Ce sont des composés polycycliques qui agissent directement en se liant de manière sélective à proximité du site catalytique de la transcriptase inverse. Ceci provoque un changement de la conformation qui va inactiver le site actif de la transcriptase inverse (Tableau 1).

Classes d'antirétroviraux	Sous classes d'antirétroviraux	Antirétroviraux approuvés	Antirétroviraux en cours d'étude
Inhibiteurs de la transcriptase inverse	Inhibiteurs nucléosidiques	Zidovudine (AZT) Didanosine (DDI) Lamuvidine (3TC) Abacavir (ABC) Zalcitabine (DDC) Emtricitabine (FTC) Stavudine (d4T) Racivir Amdoxovir Apricitabine Elvucitabine	Emtricitabine (FTC) Amdoxovir (DAPD)
	Inhibiteurs non nucléosidiques	Névirapine (NVP) Délaviridine (DLV) Efavirenz (EFV) Étravirine Rilpivirine	DPC-083 Capravirine Calanolide A

Tableau 1. Liste des inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH.

1.3.1.3. Les inhibiteurs de la protéase

Il s'agit de peptides qui miment les substrats peptidiques de la protéase. Ils interfèrent avec le processing post-traductionnel de la polyprotéine Gag-Pol en protéines de la nucléocapside et autres protéines virales (transcriptase inverse et intégrase). Il en résulte des particules virales immatures non infectieuses (Tableau 2).

Classes d'antirétroviraux	Antirétroviraux approuvés	Antirétroviraux en cours d'étude
Inhibiteurs de la protéase	Saquinavir (SQV)	Mozenavir
	Ritonavir (RTV)	TMC 114
	Indinavir (IDV)	
	Nelfinavir (NFV)	
	Amprenavir (APV)	
	Atazanavir	
	Tipranavir	
	Fosamprenavir (FPV)	
Darunavir (DRV)		

Tableau 2: Liste des inhibiteurs de la protéase du VIH.

1.3.1.3. Les inhibiteurs de l'intégrase

L'intégration de l'ADN provirale dans le génome de la cellule hôte, catalysée par l'intégrase du VIH, se fait en 3 étapes : (1) l'assemblage du complexe contenant l'ADN

viral; (2) le processing du complexe viral dans le noyau de la cellule hôte; et (3) la liaison de l'ADN viral dans le génome cellulaire. Cette étape peut être bloquée de deux manières : a) en inhibant l'activité enzymatique de l'intégrase; ou b) en synthétisant les agents qui vont bloquer le transport nucléaire du complexe viral. 3 inhibiteurs sont actuellement utilisés : Raltegravir (RGV), Elvitegravir (EVG/r) et MK-2048.

1.3.1.4. Les inhibiteurs de l'entrée du VIH-1

Les inhibiteurs de l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible ciblent l'une des trois étapes suivantes : (1) la liaison au récepteur CD4 cellulaire; (2) la liaison au co-récepteur CCR5 ou CXCR4; et (3) la fusion des membranes. Ainsi, il y a des inhibiteurs de l'attachement au CD4, dont PRO 542, une protéine de fusion entre CD4 et IgG2, qui se lie à la gp120; des inhibiteurs de la liaison au corécepteur comme la Schering C (SCH-C) qui cible le CCR5; et des inhibiteurs de fusion comme l'Enfuviritide (T-20) qui est un peptide qui se lie à la Gp41 et inhibe la fusion entre les membranes cellulaire et virale (Tableau 3).

Classes d'antirétroviraux	Sous classes d'antirétroviraux	Antirétroviraux approuvés	Antirétroviraux en cours d'étude
Inhibiteurs d'entrée	Inhibiteurs de l'attachement	TNX-355	PRO 542 BMS806
	Inhibiteurs de la liaison des corécepteurs	Maraviroc Vicriviroc	TAK 779 Ancriviroc (SCH-C) Alpaviroc Plerixafor
	Inhibiteurs de la fusion membranaire	Enfuviritide (T-20)	

Tableau 3: Liste des inhibiteurs de l'entrée du VIH dans la cellule hôte

1.3.2. Principales limites de la prophylaxie antirétrovirale

1.3.2.1. Inaccessibilité aux traitements

Malgré l'énorme amélioration de la qualité de vie des personnes infectées par la prophylaxie antirétrovirale, fort est de constater que la couverture de la prévention et du traitement reste inégale dans plusieurs régions. Moins d'une personne sur cinq a accès à des services de prévention du VIH dans les pays à faible et moyen revenus. Entre cinq et six millions de personnes ont besoin d'un traitement contre le VIH. En juin 2004, on estimait que 440, 000 personnes avaient accès à un traitement antirétroviral dans le monde en développement par rapport à 200, 000 deux ans auparavant. Si le nombre de personnes sous traitement a plus que doublé, moins de 10% des personnes qui en ont besoin principalement en Afrique subsaharienne en bénéficient (ONUSIDA 2004).

1.4. Diversité génétique du VIH-1

1.4.1. Origine

L'énorme diversité génétique du VIH-1 et son extraordinaire capacité d'échapper aux pressions sélectives, grâce à la variation génétique, font partie des principaux obstacles à l'élaboration de vaccins efficaces et de thérapies contre ce pathogène. Ces propriétés résultent d'une combinaison de facteurs. D'abord, le fort taux de mutation du VIH résultant des erreurs introduites par la transcriptase inverse, qui fait 0,2 erreurs par génome durant chaque cycle de réplication (Preston et al. 1988). Ensuite, l'important turnover du virus, dont le temps de génération est approximativement de 2.5 jours, et qui selon certains estimés, produit de 10^{10} - 10^{12} nouveaux virions chaque jour (Perelson et al. 1996). Puis, la pression sélective de la réponse immunitaire, exercée par les anticorps neutralisants

(Richman et al. 2003; Wei et al. 2003), les cellules T auxiliaires (Ross and Rodrigo 2002) ou les lymphocytes T cytotoxiques (Phillips et al. 1991; Ogg et al. 1998; Kelleher et al. 2001; Yusim et al. 2002). Enfin, il y a la recombinaison génétique, une partie intégrale du cycle de réplication, qui survient quand la transcriptase inverse saute d'un brin d'ARN à un autre durant la réplication (Blackard et al. 2002). Le taux de recombinaison du VIH, estimé à 3 recombinaisons par cycle de réplication, est l'un des plus élevés de tous les organismes (Zhuang et al. 2002). Le fait que la majorité des cellules infectées arborent au moins deux provirus différents (Jung et al. 2002), que de nombreuses évidences de "superinfections" aient été rapportées (Jost et al. 2002; Koelsch et al. 2003), et que des études récentes supportent l'implication de la superinfection dans la recombinaison (Fang et al. 2004; Hu et al. 2005; Charpentier et al. 2006), soulignent le rôle central de la recombinaison dans la génération de la diversité génétique du VIH-1. Il est important de préciser que la superinfection se définit comme étant l'infection d'un individu infecté par le VIH par une seconde souche de VIH-1 et cela, après le développement de l'immunité contre la première souche virale (Zhu et al. 1995; Yerly et al. 2004).

Par ailleurs, le VIH-1 évolue spontanément en absence de sélection au sein d'une personne infectée, et est présent sous forme d'un mélange de variants génétiquement distants mais toutefois apparentés, appelé "quasiespèce". Ces quasiespèces représentent toutes les formes génétiques possibles, comme le montre la présence des mutations associées aux résistances aux antirétroviraux chez les patients non traités (1994; Najera et al. 1995).

1.4.2. Classification

En se basant sur les analyses phylogénétiques, 3 groupes de VIH-1 ont été reconnus : M (main), O (outlier), et N (non-M, non-O). Le groupe M, comprenant la majorité des souches virales trouvées dans le monde, est à l'origine de la pandémie. Les cas d'infections par les virus du groupe O, minoritaires, ont été répertoriés en Afrique centrale

(Cameroun et pays voisins). Seulement quelques cas d'infections par le groupe N, tous confinés au Cameroun, ont été rapportés jusqu'à présent (Simon et al. 1998; Yamaguchi et al. 2006). On pense que chacun des trois groupes de VIH-1 représente un cas indépendant de transmission entre espèces d'un virus génétiquement apparenté. Ainsi, sur la base de la topologie des arbres phylogénétiques (Fig. 1-5), le VIH-1 proviendrait du virus de l'immunodéficience simien (SIVcpz) du chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes*, que l'on trouve au centre ouest de l'Afrique (Cameroun, Gabon, République démographique du Congo) (Hahn et al. 2000; Santiago et al. 2003). Keel et al. Viennent d'identifier les anticorps anti-SIVcpz ainsi que l'ARN du SIVcpz chez les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* sauvages, établissant ainsi qu'il est le réservoir naturel du VIH-1, ils situent également l'origine géographique du VIH-1 au Cameroon (Keele et al. 2006).

Neuf sous types ou clades sont identifiés parmi le groupe M, incluant A-D, F-H, J et K (Robertson et al. 2000). Plus de 34 autres formes génétiques, des recombinants inter clades possédant des segments génomiques qui se regroupent avec différents sous types, sont connues sous l'appellation CRF (circulating recombinant forms) (Fig. 1-6) (Robertson et al. 2000; Peeters et al. 2003; Tovanabutra et al. 2005; Watanaveeradej et al. 2006). Les CRF sont identifiés par les nombres, qui correspondent à l'ordre de leur découverte, suivis par les lettres du sous type parental (U indique une forme unique) ou cpx (pour des complexe) pour des formes dérivant de plus de 2 sous types parentaux (Thomson et al. 2002).

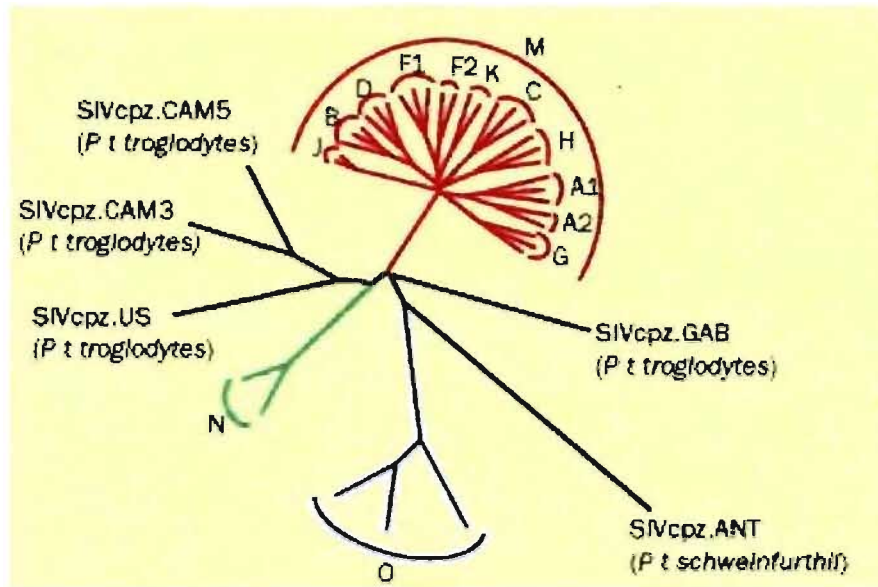


Figure 1-5. Arbre phylogénétique représentant les différents groupes et sous types du VIH-1. Analyse faite à partir des séquences de génomes entiers des isolats VIH des groupes M, O et N. Les séquences des souches SIV des chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* (P t troglodytes) et *Pan troglodytes schweinfurthii* (P t schweinfurthii) sont aussi incluses dans l'arbre, tiré de (Thomson et al. 2002).

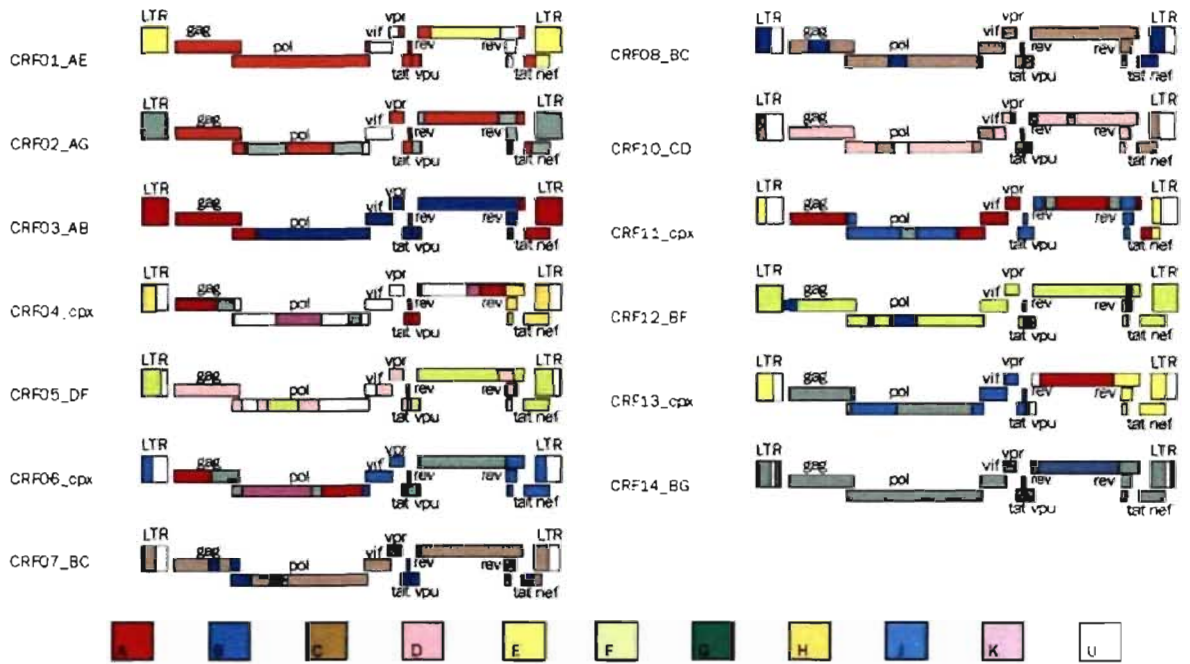


Figure 1-6. Illustration de la structure mosaïque des génomes de certaines des formes recombinantes du VIH-1. Les lettres et les couleurs représentent les différents sous types du VIH-1, tiré de (Thomson et al. 2002).

1.4.3. Méthodes d'identification

L'analyse phylogénétique des séquences, qui permet non seulement de déterminer la clade mais aussi d'avoir des informations épidémiologiques sur l'origine et la propagation de virus dans la population, reste la méthode de référence. D'autres méthodes peuvent être utilisées comme alternatives au séquençage (Thomson et al. 2002). L'une d'elles est le HMA (pour heteroduplex mobility assay) basé sur la mobilité électrophorétique des duplexes d'ADN formés par l'hybridation d'une séquence amplifiée avec une série de séquences de références de différents sous types (Delwart et al. 2003). Le sérotypage est aussi utilisé, cette dernière est basée sur la liaison des anticorps sériques aux peptides, représentant un segment de la boucle V3, de différents sous types. Mais le sérotypage ne peut pas identifier les formes recombinantes. Ces 2 dernières méthodes sont moins adaptées aux régions où il y a une forte hétérogénéité génétique du VIH-1, du fait de leur imprécision et de leur fort taux d'erreurs. Enfin, les critères suivants doivent être remplis pour qu'un virus soit reconnu comme un sous type : (1) un minimum de 2 isolats doivent être entièrement séquencés, (2) ils doivent être identiques et ne ressembler à aucun sous type existant, et (3) ils doivent avoir été identifiés dans au moins 2 individus qui n'ont aucun lien épidémiologique (Carr et al. 1998).

1.4.4. Répartition géographique

À l'échelle mondiale (Fig. 1-7), les formes génétiques les plus prévalentes sont les clades C, A, B et CRF02_AG. La majorité des infections dans la partie sud de l'Afrique, en Inde et en Éthiopie est causée par la clade C, qui circule aussi au Brésil et en Russie. Les virus de sous type A, quant à eux, sont prédominants dans le Centre et l'Ouest de l'Afrique (Kenya, Ouganda, Tanzanie et Rwanda), et en Europe de l'Est. Toutefois, dans tout l'ouest de l'Afrique et une partie de l'Afrique Centrale, la forme génétique la plus rencontrée est le CRF02_AG. La clade B est la principale forme en Europe Centrale, en Amérique, en

Australie ainsi que dans certains pays de l'Asie du Sud-Est, de l'Afrique du Nord et du Moyen Orient.

D'autres variants moins répandus à l'échelle mondiale, mais ayant une localisation plus restreinte sont le sous type D, principalement distribués dans l'est de Afrique (Ouganda, Tanzanie et Kenya), le sous type F qui prédomine en Roumanie et dans une moindre mesure au Brésil, le sous type G qui circule dans le centre et l'ouest de l'Afrique mais aussi au Portugal et dans le nord-ouest de l'Espagne; et le CRF01_AE hautement prévalent en Asie (Thomson et al. 2002; Spira et al. 2003).

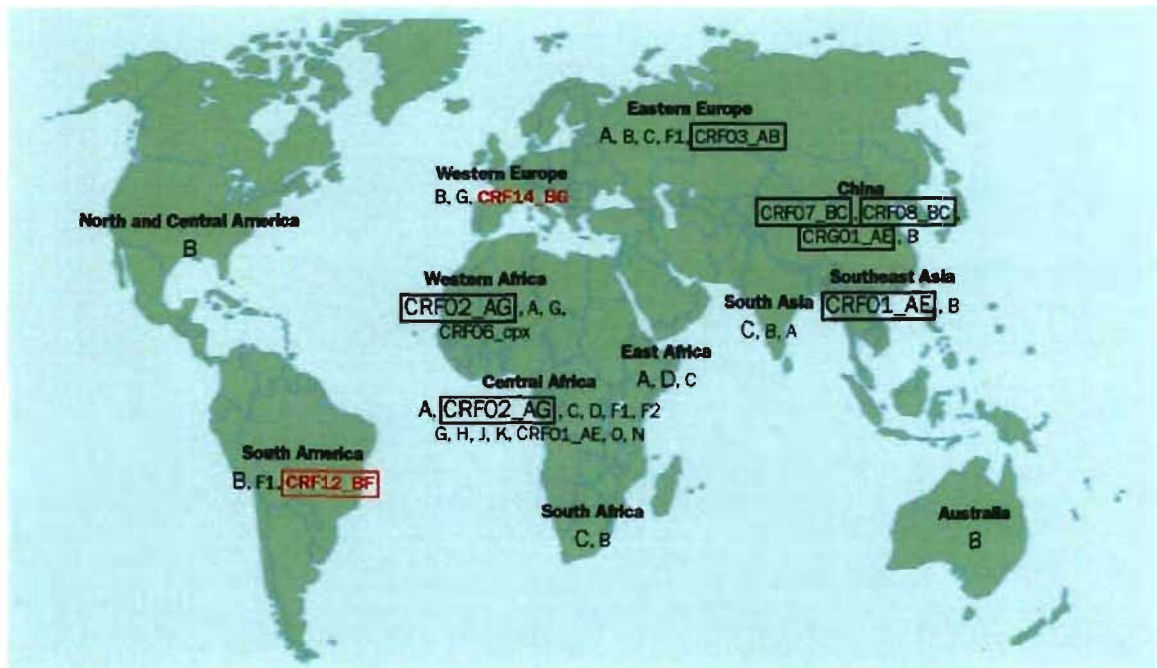


Figure 1-7. Distribution géographique des formes génétiques du VIH-1. Les formes génétiques prédominantes dans les différentes régions sont indiquées par les lettres de plus grosse taille. Les formes recombinantes d'importance épidémiologique sont encadrées. Tiré de Thomson et al. (2002).

1.4. 5. Mouvement des populations et expansion des clades

Une association entre les infections au VIH et les voyages avait été faite au début de l'épidémie en Europe de l'Ouest (Clumeck et al. 1984; Melbye et al. 1984; Jonassen et al. 1997). En Afrique sub-saharienne, les voyages ont aussi été associés à la propagation de VIH-1, comme l'illustre la forte prévalence d'infections chez les conducteurs de camions de longue distance et les travailleurs expatriés itinérants (Kane et al. 1993; Bwayo et al. 1994). Ainsi, l'augmentation des déplacements internationaux durant les dernières décennies a contribué d'une manière déterminante à la dissémination rapide du VIH-1 dans le monde.

En effet, une proportion considérable d'infections par les sous types non-B du VIH-1 a été rapporté en Europe et en Amérique (Fransen et al. 1996; Alaeus et al. 1997; Boni et al. 1999; Weidle et al. 2000; Couturier et al. 2000; Esteves et al. 2002; Chaix et al. 2003). Les données se rapportant au Canada montrent que la majorité de ces infections a été acquise, ou est directement liée aux personnes ayant vécu dans les régions à forte prévalence de VIH-1, où les épidémies causées par les clades non-B prédominent, principalement en Afrique sub-saharienne et en Asie du sud-est (Sides et al. 2005; Akouamba et al. 2005).

Plusieurs catégories de voyageurs sont susceptibles de contribuer à la dissémination des sous types non-B. Parmi ceux-ci, on trouve les immigrants provenant de régions endémiques, le personnel militaire déployé dans ces régions (Lasky et al. 1997; Brodine et al. 1999; Brodine et al. 2003), les marins (Ollero et al. 1991; Thomson et al. 2001), les expatriés (Bonneux et al. 1988), et les touristes sexuels (Gillies et al. 1992; Dietrich et al. 1997; Belda et al. 1998). Par ailleurs, les conflits armés entraînent des déplacements massifs des personnes. En janvier 2002, plus de 6 millions de personnes d'Afrique sub-saharienne ont été pris en charge par la Haute Commission aux Réfugiés des Nations Unies (HCR) (Buve et al. 2002).

1.4.6. Impact de la diversité des clades

1.4.6.1. Pathogénèse et transmission

Il a été suggéré que les sous types viraux pouvaient influencer la transmissibilité et la pathogénèse du VIH-1, mais l'existence de plusieurs autres facteurs qui influencent ces paramètres rend difficile l'établissement de ces associations.

La plupart des clades causent la maladie en déployant le phénotype CCR5+/NSI au début de la maladie et le phénotype CXCR4/SI au stade finale de la maladie (Nielsen et al. 1993; Keet et al. 1993; Cornelissen et al. 1995). Toutefois, cette corrélation n'est pas toujours vraie pour les clades A, C ou D. Les virus de sous-type A ont tendance à favoriser le phénotype CCR5 même tard dans la maladie (Chen et al. 2000). Les variants de clade C ont une fréquence d'utilisation du CXCR4 remarquablement faible, même chez les patients qui ont développé le SIDA (Abebe et al. 1999), alors que les sous-types D semblent ne pas montrer un double tropisme pour CXCR4 et CCR5 (Tscherning et al. 1998).

L'effet des sous types sur la pathogénèse a été investigué dans plusieurs études. Une étude réalisée sur des prostituées du Sénégal a montré que les femmes infectées par les variants C, D ou G avaient 8 fois plus de chance de développer le SIDA que celles infectées par la clade A (Kanki et al. 1999). Une autre étude ougandaise, portant cette fois sur 1045 personnes infectées par les sous types A ou D, a montré une association entre la clade D, un faible décompte CD4 et la progression rapide vers la mort (Kaleebu et al. 2002). L'implication de la diversité génétique dans la transmission mère-enfant du VIH sera discutée dans la section 1.6.4.5.

1.4.6.2. Thérapie antirétrovirale

Parce qu'il est bien connu que les virus VIH-1 du groupe O sont naturellement résistants aux inhibiteurs de RT non-nucléosidiques (Quinones-Mateu et al. 1998), on pense

que d'autres formes génétiques pourraient avoir des degrés de susceptibilité variables aux antirétroviraux. Des études *in vitro* ont démontré que les sous-types du groupe M avaient une susceptibilité similaire aux agents antirétroviraux, avec une éventuelle exception pour la clade G dont la sensibilité aux inhibiteurs de protéases semble être réduite (Descamps et al. 1998). Les mutations conférant une résistance secondaire aux inhibiteurs de protéases semblent être plus fréquentes chez les personnes infectées par les virus non-B (Pieniazek et al. 2000), bien que le spectre des mutations, de la protéase et de transcriptase inverse qui sont associées aux résistances majeures soit semblable chez les virus B et non-B (Perez-Alvarez et al. 2001). Des données contradictoires ont été obtenues concernant les isolats de clade C, alors que certains ne rapportent aucune différence dans la sensibilité des virus B et non-B aux antirétroviraux (Shafer et al. 1997; Birk and Sonnerborg 1998). D'autres au contraire, pensent que les clades C doivent avoir une résistance innée aux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (Loomba et al. 2002a; 2002b). Enfin, il a récemment été rapporté que les sous types non-B semblaient être moins sensibles à la HAART (Caride et al. 2001; Brenner et al. 2002).

1.4.6.3. Diagnostique

Il est absolument essentiel que les trousse de détection disponibles actuellement soient capables de diagnostiquer les infections par les virus B et non-B, y compris les formes recombinantes. Bien que des études indépendantes aient montré que les tests disponibles peuvent détecter les infections par les sous types A-G, J et le groupe O (Koch et al. 2001), des différences ont été notées quant à la détection des anticorps précoces correspondant aux infections récentes par les virus B et le CRF01_AE (Parekh et al. 2001). À l'heure actuelle, on recommande l'utilisation des trousse les plus récentes, de quatrième génération, qui combinent dans un seul test la détection des anticorps anti-VIH et des antigènes p24.

Les versions courantes des trousse de détection de charge virale, LCx HIV-RNA quantitative assay (Lcx; Abbott), HIV-1 Quantiplex branched DNA (bDNA; Chiron Diagnostics) et Amplicor HIV-1 Monitor v1-5 (Monitor; Roche Diagnostics) sont capables de quantifier l'ARN des isolats de clade A-G (Swanson et al. 2001).

1.4.6.4. Vaccination

L'une des principales limites des stratégies de vaccination, testées contre les lentivirus des primates, est leur inaptitude à générer les réponses protectrices contre les challenges par les virus hétérologues.

Certains travaux portant sur la sensibilité aux anticorps neutralisants, et utilisant les échantillons de sérum des personnes infectées par le VIH-1 et des isolats primaires (cliniques), ont permis de conclure qu'il n'y avait aucune corrélation entre les sérotypes de neutralisation et les sous types viraux (Moore et al. 1996; Kostrikis et al. 1996; Nyambi et al. 1996). Toutefois, des activités neutralisantes clade-spécifiques associées à des échantillons de sérum et des anticorps monoclonaux ont été rapportées (Moore et al. 1995; Trkola et al. 1995; Bures et al. 2002).

Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré la présence de LTC ayant une réactivité croisée effective pour les clades du VIH-1 chez les personnes infectées ou vaccinées (Ferrari et al. 1997; Cao et al. 1997a; Durali et al. 1998; Cao et al. 2000). Cependant, les réponses LTC intra clades sont généralement plus fortes et plus fréquemment détectées que la réactivité croisée inter clade.

1.6. Transmission mère-enfant du VIH-1

1.6.1. Prévalence de l'infection par le VIH chez les femmes

17,5 millions de femmes vivent avec le VIH dans le monde, soit un million de plus qu'en 2003 (ONUSIDA, 2006). Elles représentent dorénavant près de 50 % des adultes porteurs du virus. Dans plusieurs pays d'Afrique australe, plus des trois quarts des jeunes vivant avec le VIH sont des femmes. Dans l'ensemble de l'Afrique subsaharienne, les jeunes femmes de 15 à 24 ans ont au moins trois fois plus de chances d'être porteuses du virus que les jeunes hommes (ONUSIDA, 2006). En 2004, un rapport montrait que le nombre de femmes vivant avec le VIH avait augmenté dans chacune des régions du monde au cours des deux dernières années, les augmentations les plus fortes étant relevées en Asie de l'Est (56%), en Europe orientale et en Asie centrale (48%) (ONUSIDA 2005).

Au Canada, 60,000 personnes dont 9,600 femmes étaient infectées par le VIH en 2005 (ONUSIDA 2005). 20 % des personnes vivant avec le VIH étaient des femmes et ces dernières représentent également 27 % de tous les nouveaux cas d'infection en 2005 (Agence de Santé publique du Canada, 2006).

1.6.2. Taux de transmission du VIH de la mère à l'enfant

Le problème de transmission du VIH de la mère à l'enfant, aussi appelé transmission verticale, demeure très préoccupant dans les pays du Sud car au Nord, il a été pratiquement résolu. En effet, en absence de thérapie, le taux de transmission verticale du VIH se situe entre 13 et 42% dans les pays en voie de développement, et entre 14 et 25% en Europe et aux États-Unis d'Amérique (The Working Group on Mother-To-Child Transmission of HIV, 1995).

1.6.3. Mécanismes de transmission

Il est clairement établi que la transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant peut se faire *in utero* par passage transplacentaire, *intra-partum* au contact du sang et des sécrétions vaginales maternels pendant le travail et l'accouchement, ou *post-partum* lors de l'allaitement (Lapointe et al. 1985). Chez les femmes qui allaitent, on estime que près de 23% des transmission surviennent *in utero*, 65% *intra-partum* et 12 à 14% *post-partum* (Dunn et al. 1992; Bertolli et al. 1996). Dans une cohorte de femmes qui n'allaitaient pas en Thaïlande, près de 75% de nouveaux-nés avaient été infectés pendant le travail et l'accouchement et 25% *in utero* (Mock et al. 1999).

1.6.3.1. Transmission *in utero*

Nombre d'évidences supportent la transmission *in utero* du VIH-1, incluant : a) la détection du virus dans les tissus fœtaux (Sprecher et al. 1986; Douglas and King 1992; Brossard et al. 1995); b) le début de la phase symptomatique de la maladie pendant la vie intra utérine (Rudin et al. 1993); et c) la détection du virus dans le liquide amniotique (Mundy et al. 1987; Mohlala et al. 2005). De plus, le fait que le virus soit détectable durant les premiers jours de vie chez une proportion d'enfants infectés par le VIH (Dunn et al. 1995; Kuhn et al. 1996; Kalish et al. 1997); et la progression rapide de la maladie chez certains enfants (Galli et al. 1995; De Rossi et al. 1996; Shearer et al. 1997) renforce l'idée de la transmission intra utérine du VIH-1. Les critères de détermination d'une transmission *in utero* sont bien établis : la détection du génome viral par PCR ou l'isolement du virus dans le sang du nouveau-né doivent se faire dans les 48 heures qui suivent la naissance (Bryson et al. 1992).

D'une façon générale, les trophoblastes sont susceptibles à l'infection par le VIH, avec toutefois un faible niveau de production virale (Mognetti et al. 2000). En effet, certaines cellules placentaires comme les cellules d'Hofbauer et les cellules du trophoblaste

expriment le CD4, et elles sont capables de soutenir une infection par le VIH *in vitro* (Douglas and King 1992; David et al. 1995). De plus, les macrophages du placenta expriment le corécepteur CCR5 et la surexpression de ce dernier a été associée à la transmission verticale du VIH (Behbahani et al. 2000; Torres et al. 2001). Cependant, une récente étude fait état de l'entrée du VIH dans le trophoblaste par endocytose (Vidricaire et al. 2003) ou par une voie CD4-indépendante (Al-Harathi et al. 2002). L'entrée du VIH semble par ailleurs plus importante quand les trophoblastes sont en contact avec les lymphocytes T infectés plutôt qu'avec les virions libres. L'adhérence entre les deux types de cellules formerait une « synapse virale » revue par (Piguet and Sattentau 2004) pouvant favoriser l'endocytose des virions ou l'expression des molécules de surface requises pour l'entrée du VIH (Arias et al. 2003). Le processus de transcytose, transport transcellulaire qui permet le transfert des macromolécules de la circulation maternelle vers la circulation fœtale, permettrait aussi le passage du VIH du pôle apical au pôle basolatéral du trophoblaste (Lagaye et al. 2001). Enfin, l'intervention de récepteurs de la partie Fc des anticorps ou des glycolipides dans le processus de pénétration du VIH dans le trophoblaste, a été suggérée (David et al. 1995; Lagaye et al. 2001).

La voie exacte empruntée par le virus pour traverser le placenta demeure inconnue. Toutefois, on pense que la transmission puisse se faire suite à l'interaction entre les cellules du trophoblaste et les virus libres ou des cellules maternelles infectées. Des nouveaux virions, qui bourgeonnent du côté basolatéral, pourraient ainsi entrer en contact avec les cellules endothéliales ou les macrophages sous-jacents pour, finalement, atteindre la circulation fœtale (Fig 1-8).

Plusieurs évidences indiquent que le fœtus est exposé au sang maternel, et par conséquent aux particules virales VIH-1 et aux cellules infectées par le VIH-1, pendant la grossesse et l'accouchement. En effet, les cellules maternelles sont toujours présentes dans les échantillons du sang du cordon ombilical, à une fréquence estimée de $1/10^4$ - 10^5 cellules nucléées (Socie et al. 1994; Petit et al. 1995). De plus, il est bien connu que le VIH-1

infecte les cellules placentaires (Maury et al. 1989; Kesson et al. 1993; Schwartz et al. 1995), et la fréquence élevée de chorioamniotite, une inflammation des membranes placentaires, chez les femmes infectées pourrait augmenter les échanges entre les cellules fœtales et maternelles et donc le transfert du VIH-1 (Patterson et al. 2001; Bhoopat et al. 2005; Taha et al. 2006).

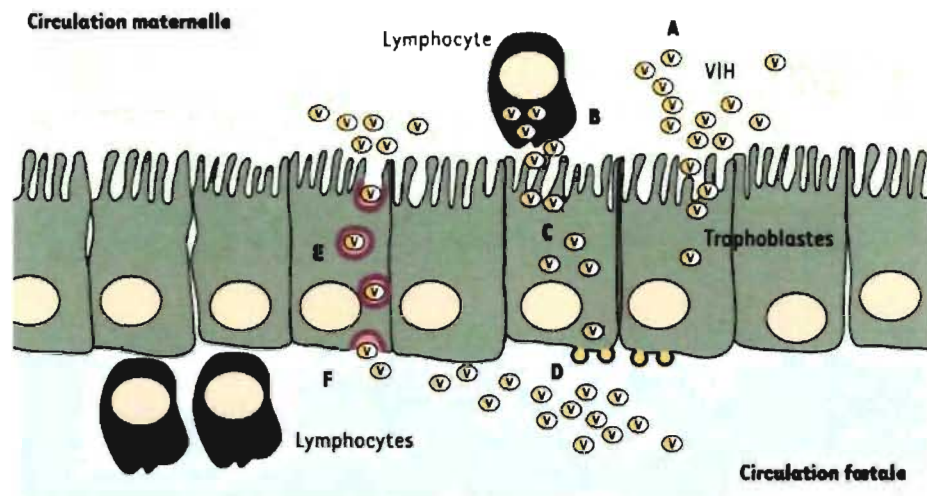


Figure 1-8. Mécanisme de transmission du VIH *in utero*. Entrée en contact des virions libres A, des cellules infectées B, présents dans la circulation maternelle, avec les cellules trophoblastiques. C Entrée du VIH dans les cellules trophoblastiques par des mécanismes hypothétiques: fusion membranaire ou endocytose. D bourgeonnement de nouveaux virions au pôle basolatérale (circulation fœtale). E Endocytose et transcytose du VIH. F Arrivée du VIH au niveau des cellules fœtales. Tiré de (Vidricaire et al. 2004)

1.6.3.2. Transmission *intra-partum*

La transmission durant le travail ou l'accouchement est à l'origine de près de 50% des cas d'infection chez les enfants (Bryson et al. 1992). Elle peut se faire par le contact direct de l'enfant, dans le canal utérin, avec le sang et les sécrétions génitales maternels contaminés par le VIH, par l'infection ascendante du vagin ou du col de l'utérus vers les membranes fœtales et le liquide amniotique, et par l'absorption dans le tractus digestif de l'enfant (Nielsen et al. 1996). En effet, il est possible d'obtenir du VIH-1 à partir des cultures des fractions (cellulaires et non cellulaires) vaginales et des sécrétions endocervicales des femmes infectées par le VIH-1 (Vogt et al. 1986). Les particules virales et cellules infectées par le VIH-1 ont été trouvées dans les sécrétions génitales des femmes (Clemetson et al. 1993; Henin et al. 1993; Mostad et al. 1997). Par ailleurs, il a été montré que le risque de transmettre le VIH-1 au premier né de jumeaux était deux fois plus élevé que celui de le transmettre au second (Goedert et al. 1991; Bulterys et al. 1992), cela étant supposément dû à la plus longue période d'exposition du premier enfant aux matériels infectieux maternels pendant le travail. La survenue de la transmission *intra-partum* est supportée par de nombreuses preuves indirectes, incluant le fait que plus de 50% des enfants infectés ont un test de dépistage négatif durant les premiers jours de leur vie (Dunn et al. 1995; Kuhn et al. 1996; Kalish et al. 1997), que la fréquence de détection du virus augmente durant les premières semaines de vie (Dunn et al. 1995), et que certains nouveaux-nés ont des profils immunologiques et virologiques similaires à ceux des adultes en infection primaire (Brandt et al. 1996; Rich et al. 1997).

1.6.3.3. Transmission *post-partum*

La transmission par l'allaitement est à l'origine de la plupart des cas de transmission *post-partum* (Dunn et al. 1992; Kreiss 1997). On ignore toujours si l'infection se fait à partir de virus libres ou de cellules infectées, qui ont tous deux été détectés dans le lait maternel (Lewis et al. 1998; Pillay et al. 2000; Rousseau et al. 2003). Il est possible que le

virus pénètre la muqueuse du tractus gastro-intestinal de l'enfant en infectant les cellules ou qu'il accède directement au système sanguin par des brèches dans la muqueuse. Néanmoins, il est bien établi qu'un faible décompte CD4, une mastite et une longue durée d'exposition augmentent le taux de transmission du VIH-1 par l'allaitement (Nduati et al. 1995; Semba et al. 1999). De plus, une association a été faite entre la quantité de cellules infectées par le VIH dans le lait et le risque de transmission (Rousseau et al. 2004). La transmission post-partum du VIH est associée à la durée d'exposition au lait maternel, à l'infectivité du lait, et à la susceptibilité spécifique de l'enfant (Newell 1998).

1.6.4. Facteurs qui influencent la transmission mère-enfant du VIH-1

1.6.4.1. Charge virale de la mère

L'incidence de la transmission verticale du VIH peut être affectée à la fois par des facteurs virologiques et immunologiques. Un faible décompte de cellules T CD4⁺ maternelles, une forte virémie, une faible activité des LTC spécifiques aux antigènes VIH et la virulence des souches virales ont été associés à de forts taux de transmission mère-enfant du VIH-1 (Roques et al. 1993; Kliks et al. 1994; Bryson 1996; Jin et al. 1998; Plaeger et al. 1999; Cu-Uvin et al. 2006).

De nombreuses études ont démontré une association directe entre la présence d'anticorps maternels dirigés contre le domaine v3 de la protéine d'enveloppe du VIH-1 et un faible taux de transmission (Devash et al. 1990; Halsey et al. 1992; Dickover et al. 2006; Wu et al. 2006). La présence et la persistance d'anticorps sécrétés IgA et/ou IgM anti-VIH dans le lait pendant les 18 mois d'allaitement ont, quant à elles, été associées à un faible risque de transmission (Van de Perre et al. 1993).

Il a été montré qu'un niveau plasmatique élevé d'antigènes p24 et un âge maternel élevé augmentaient le risque de transmission (Mayaux et al. 1995; Lathey et al. 1999). D'autre part, plusieurs études indiquent le rôle important d'une charge virale maternelle

élevée dans la transmission du VIH à l'enfant (Sperling et al. 1996; Mayaux et al. 1997; Garcia et al. 1999) alors que Cao et les investigateurs du Ariel Project concluent qu'une forte charge virale ne peut pas à elle seule expliquer cette transmission (Cao et al. 1997b).

1.6.4.2. Facteurs génétiques

1.6.4.2.1. Concordance des antigènes HLA

L'énorme polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est à l'origine de la grande diversité des réponses immunitaires contre le VIH-1 et d'autres pathogènes dans la population humaine (Townsend and Bodmer 1989). Ce fait est consistant avec l'observation de Kilpatrick et al., qui ont rapporté, chez les enfants écossais, que l'haplotype HLA-A3-B7-DR2 était associé à la protection contre l'infection au VIH-1, alors que HLA-A1-B8-DR3 se retrouvait à une fréquence élevée chez les enfants infectés (Kilpatrick et al. 1991). Cette association a plus tard été confirmée dans le cadre d'une autre étude (Winchester et al. 1995).

La présence d'une variété de constituants de la membrane cellulaire de la cellule hôte, incluant les molécules du CMH-I et du CMH-II, à la surface du virus est bien documentée (Cantin et al. 1997; Roy et al. 2005; Martin et al. 2005). Les réponses allo immunitaires du fœtus ou du nouveau-né, dirigées contre les cellules maternelles infectées par le VIH-1 ou les virus libres portant les déterminants du CMH maternel, pourraient en partie expliquer pourquoi certains enfants nés de mères infectées sont protégés contre l'infection. Effectivement, les études réalisées chez les macaques suggèrent que les réponses immunitaires anti-CMH peuvent protéger d'une infection par le VIH-1. Dans ces études, l'immunisation avec les lignées de cellules lymphoblastiques humaines protégeait les macaques challengés par le virus de l'immunodéficience simien (SIV), lorsque celui-ci avait été cultivé avec les mêmes cellules (1990; Stott 1991). Il y avait une corrélation entre la protection et les niveaux d'anticorps anti-CMH (Chan et al. 1992). Chan et al. ont également montré que l'immunisation avec des molécules HLA de classe I purifiées

pouvait protéger des macaques challengés par les particules virales exprimant les mêmes HLA (Chan et al. 1995). Chez l'humain, cette hypothèse est supportée par les études qui associent la concordance des antigènes HLA de classe I entre la mère et son enfant à un risque élevé de transmission *in utero* du VIH-1, alors qu'une discordance entre les molécules HLA maternelles et fœtales protège l'enfant (MacDonald et al. 1998; Kuhn et al. 2004).

1.6.4.2.2. Polymorphisme de CCR5

En 1996, trois groupes indépendants ont identifié un allèle mutant, contenant une délétion de 32 paires de base dans le cadre de lecture du gène *ccr5* (mutant CCR5- Δ 32), qui induit un codon stop prématuré et une perte de l'expression du corécepteur CCR5 du VIH-1 (Liu et al. 1996; Samson et al. 1996; Dean et al. 1996). Cette mutation est présente à 1% dans son état homozygote et de 10 à 20% sous sa forme hétérozygote chez les Nord Américains et les Européens, alors qu'elle est quasiment absente chez les Africains, les Asiatiques et les Latino Américains (Martinson et al. 1997). L'allèle CCR5- Δ 32 a été identifié comme étant un polymorphisme génétique naturel réduisant le risque d'infection par le VIH-1 et la vitesse de progression de la maladie, et l'absence totale d'expression du CCR5 chez les homozygotes confère une forte protection contre l'infection par le VIH-1 macrophage tropique (McNicholl et al. 1997; Roger 1998).

Le rôle de la mutation CCR5- Δ 32 dans la transmission verticale du VIH-1, et la progression subséquente de la maladie, a été examiné chez plus de 3000 enfants de différentes origines (Edelstein et al. 1997; Rousseau et al. 1997; Shearer et al. 1998; Mangano et al. 1998; Misrahi et al. 1998; Mandl et al. 1998; Barroga et al. 2000). Malheureusement, l'hétérozygotie de CCR5- Δ 32 ne protège pas contre la transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant. Plus encore, l'effet protecteur de l'homozygotie pour CCR5- Δ 32, observé chez l'adulte, n'a pas été clairement démontré dans le cadre de la transmission verticale (Edelstein et al. 1997; Misrahi et al. 1998).

1.6.4.3. Facteurs obstétricaux

Les facteurs obstétriques tels que la rupture des membranes placentaires suite aux infections virales, bactériennes ou fongiques, les infections transmises sexuellement, la cigarette, l'utilisation des drogues injectables et la chorioamniotite ont été associés à un risque élevé de transmission (Nair et al. 1993; St Louis et al. 1993; Burns et al. 1994; Bulterys et al. 1997; Bhoopat et al. 2005). Une période de rupture des membranes supérieure à 4 heures et la naissance prématurée augmentent aussi ce risque (Goedert et al. 1989; Newell and Peckham 1993; Landesman et al. 1996). D'autres conditions cliniques particulières comme une phase aïgue d'infection au VIH durant la grossesse et d'autres infections chroniques ont été associés à la transmission mère-enfant du VIH-1 (Report of consensus workshop, 1992).

1.6.4.4. Facteurs nutritionnels

Certains facteurs nutritionnels, en particulier la déficience en vitamine A et la malnutrition, qui peuvent entraîner une immunodéficiences et affecter l'intégrité des muqueuses, ont été associés au risque accru de transmission du VIH-1 (1994; Semba et al. 1997). Cependant, plusieurs études randomisées portant sur l'administration de suppléments de vitamine A n'ont révélé aucune réduction de la transmission (Semba et al. 1999; Coutsooudis et al. 1999; Fawzi et al. 2000).

1.6.4.5. Facteurs viraux

Par ailleurs, quelques études suggèrent l'implication du phénotype et du génotype du VIH dans la transmission mère-enfant. En effet, les souches virales qui utilisent le co-récepteur CCR5 sont préférentiellement transmises aux nouveau-nés, même dans les cas où les virus utilisant les corécepteurs CXCR4 sont majoritaires chez la mère (Philpott et al. 2001; Casper et al. 2002; Arroyo et al. 2002; Skrabal et al. 2003).

Une étude menée en Tanzanie a suggéré l'implication des sous types viraux maternels dans la transmission verticale du VIH. Les virus de clade A, C et les recombinants semblent être plus souvent transmis à l'enfant que les sous types D (Renjifo et al. 2001). Une autre étude a rapporté que les virus contenant les LTR (Long Terminal Repeat) des variants C étaient 6,1 fois plus transmis que ceux qui avaient les LTR de clades D (Blackard et al. 2001). De plus, une faible diversité génétique de la région V3 du gène *env* a été associée à un risque élevé de transmission mère-enfant du VIH-1 (Dickover et al. 2001; Arroyo et al. 2002). Le type de variants maternels transmis semblent dépendre du moment de la contamination: les variants majeurs sont préférentiellement transmis *in utero* alors que les variants mineurs sont plutôt transmis *intra-partum* (Dickover et al. 2001; Verhofstede et al. 2003).

1.6.4.6. Facteurs sociaux et économiques

Les rapports sexuels non protégés et des partenaires sexuels multiples, qui peuvent entraîner l'augmentation de la diversité des souches virales et l'inflammation des muqueuses génitales et la chorioamniotite, ont été associés à la transmission du VIH au nourrisson. Une étude réalisée au Rwanda a montré que les femmes ayant, durant leur grossesse, plus de deux partenaires sexuels, avaient un risque plus élevé de transmettre le VIH à leur enfant (Bulterys et al. 1993). Dans le même sens, une étude portant sur un groupe de femmes enceintes VIH-séropositives de New York a montré que le taux de transmission était de 9,1% chez les femmes qui avaient des rapports protégés, 22,2% chez celles qui avaient une fréquence modérée d'activité sexuelle et 39% chez celles qui avaient une forte fréquence (Matheson et al. 1996).

1.7. Moyens de prévention

1.7.1. Agents antirétroviraux

En 1994, le protocole 076 de la Pediatric AIDS Clinical Trials Groups (PACTG076) a démontré qu'on pouvait réduire de 25,5% à 8,3% le taux de transmission maternofoetale du VIH au moyen d'un régime thérapeutique comprenant l'administration par voie orale de d'AZT à partir de la quatorzième semaine de grossesse, une injection d'AZT par voie intraveineuse pendant le travail, et le traitement par voie orale du nouveau-né pendant six semaines *post-partum* (Connor et al. 1994; Dabis et al. 2000; Thorne and Newell 2000). Aujourd'hui, on recommande l'initiation, durant la grossesse, d'une combinaison de régimes antirétroviraux qui inclut les inhibiteurs de protéase en vue de mieux contrôler la réplication virale, de préserver les fonctions immunitaires et de réduire le développement de souches résistantes (Perinatal HIV Guidelines Working Group Members, 2005).

L'utilisation de prophylaxie antirétrovirale a réduit considérablement le risque de transmission mère-enfant du VIH-1 dans les pays développés. En Europe, le nombre de femmes enceintes infectées par le VIH et traitées a augmenté de 5 à 92% entre 1997 et 2003, aboutissant à un taux de transmission mère-enfant de 0,99% en 2003 (European collaborative study, 2005). Les déclin similaires ont été observés aux États-Unis où les taux de transmission en 2000 oscillaient entre 1% et 3.7% (Wade et al. 2004; Magder et al. 2005). Au Canada, l'incidence d'infection à VIH chez les nourrissons est passé de 33% durant la période 1994-1995 à 2,6% en 2000 (Santé Canada, 2002). Plus encore, au CHU Sainte-Justine cette incidence est de 0.39% depuis 1998 (Dr Normand Lapointe, données non publiées).

Il est fortement conseillé d'initier la trithérapie durant les deux derniers trimestres de la grossesse pour les femmes qui ont des signes symptomatiques d'une infection au VIH (charge virale élevée, faible décompte CD4). Pour celles qui ne suivent aucun traitement,

divers régimes sont conseillés : a) faire une injection d'AZT pendant le travail et mettre l'enfant sous AZT pendant six semaines *post-partum*; b) administrer une combinaison d'AZT et de 3TC par voie orale pendant le travail et à l'enfant pour une semaine; c) une dose unique de névirapine (NVP) pendant le travail et au nouveau-né 48 heures après la naissance; et d) une dose unique de NVP à la mère et à l'enfant, combinée à une injection d'AZT pendant le travail et six semaines d'AZT au nouveau-né (Perinatal HIV Guidelines Working Group Members, 2005).

L'efficacité de la NVP dans la prévention de la transmission du VIH à l'enfant a été largement documentée dans les pays en voie de développement. En effet, une dose unique de NVP administrée à la mère pendant le travail et au nouveau-né réduit le risque de transmission mère-enfant de 41% (Jackson et al. 2003). Plus important encore, il a été démontré que la dose unique de NVP était plus effective qu'une monothérapie d'AZT, et était équivalente à une combinaison NVP/AZT (Guay et al. 1999; Taha et al. 2004). Son activité antirétrovirale, son absorption rapide, son transfert placentaire, et sa longue demi-vie contribuent à son efficacité dans la prévention de la transmission verticale du VIH (Mirochnick et al. 1998; Musoke et al. 1999). Actuellement, l'Organisation Mondiale de la Santé recommande l'addition d'une dose unique de NVP à l'AZT ou à la combinaison AZT/3TC (Organisation Mondiale de la Santé, 2005).

1.7.2. Limites de la thérapie antirétrovirale

1.7.2.1. Accès limité au traitement

L'accès limité à la thérapie dans les pays en voie de développement (Teixeira et al. 2004; Badri et al. 2006) explique en partie le nombre croissant d'enfants infectés, 90% des nouveaux cas d'infections en 2005, par le VIH en Afrique sub-saharienne (ONUSIDA, 2005).

1.7.2.2. Toxicité médicamenteuse

L'utilisation d'agents antirétroviraux durant la grossesse est de plus en plus répandue et un nombre croissant d'évidences montre que leurs effets bénéfiques continuent à dépasser leurs risques potentiels. Cependant, les antirétroviraux ont été associés à une augmentation de cas d'anémies, et leur administration tardive durant la grossesse a été associée à un surcroît de diabètes gestationnels et d'accouchements prématurés (Tuomala et al. 2005).

Les régimes thérapeutiques à base d'inhibiteurs de protéase ont été associés à une aggravation du diabète mellitus, du diabète gestationnel et de l'hyperglycémie (Watts et al. 2004; Tuomala et al. 2005; 2006b; El-Beitune et al. 2006a). Des troubles gastro-intestinaux et des hyperglycémies liés à l'utilisation du nelfinavir, et des toxicités hépatiques associées à la névirapine ont été également rapportés chez la femme enceinte (Timmermans et al. 2005).

Par ailleurs, de nombreuses évidences démontrent une augmentation du risque d'atteintes hépatiques, pouvant être fatales et souvent associées à des éruptions cutanées, chez les femmes dont le décompte CD4 dépasse 250 cellules/mm³ avant l'initiation de la thérapie antirétrovirale combinée ou HAART (pour Highly Active Antiretroviral Therapy) (Leith et al. 2005). C'est ainsi que la US Food and Drug Administration ne recommande l'utilisation de régimes combinés incluant la névirapine que lorsque les risques ont été bien évalués (US Food and Drug Administration, 2005; US Public Health Service, 2005). Par ailleurs, les risques d'acidose lactique et de pancréatite liés à l'utilisation de la didanosine (DDI) et la stavudine (D4T) durant la grossesse ont été rapportés (Grimbert et al. 1993; Brinkman et al. 1998).

1.7.2.3. Résistance aux agents antirétroviraux

L'un des grands problèmes associés à la thérapie à base d'agents antirétroviraux est l'induction de la résistance à ces agents. De nombreuses études ont été menées sur la zidovudine, certaines indiquant que la fréquence des résistances à cet agent est plus élevée chez les mères qui transmettent le virus à leurs enfants (Colgrove et al. 1998; Welles et al. 2000), d'autres ne trouvant aucune association entre la résistance et la transmission (Eastman et al. 1998; Johnson et al. 2001). Cependant, la transmission des variants viraux maternels résistants à la zidovudine à l'enfant est bien établie (Johnson et al. 2001).

D'autre part, des inquiétudes demeurent quant à la sélection de mutations entraînant la résistance aux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI), plus particulièrement dans le contexte de l'utilisation d'une dose unique de NVP pour prévenir la transmission mère-enfant du VIH-1 (Palmer et al. 2006). Administrée en monothérapie, la NVP induit en une semaine les mutations de résistance K103N et/ou Y181C, qui confèrent une résistance croisée aux autres NNRTI (Richman et al. 1994; Havlir et al. 1996; Deeks 2001). Le fait qu'une seule mutation (K103N) suffise pour conférer une telle résistance (Jackson et al. 2000; Flys et al. 2005) et que la NVP ait une longue demi-vie (20 jours) favorise cette sélection (Cressey et al. 2005). L'émergence de cette résistance est très répandue, avec une fréquence de détection variant de 15 à 75% selon la technique de génotypage utilisée (2004bb; Eshleman et al. 2004aa). Cette résistance et constitue un problème particulièrement inquiétant compte tenu du fait que ce médicament est destiné à être utilisé à grande échelle dans les pays en voie de développement.

Récemment, il a été suggéré que l'apparition de la résistance à la NVP dépendait du sous-type viral. En effet, le taux de résistance était plus élevé chez les femmes enceintes infectées par des virus de clade C que chez celles infectées par des variants de clade A (Eshleman et al. 2004aa). 20 à 50% d'enfants infectés par le VIH et exposés à cette dose unique de névirapine ont développé des variants résistants (Cressey et al. 2005). Toutefois,

le profil des mutations spécifiques est généralement différent de celui retrouvé chez la mère, ces mutations semblant émerger *de novo* chez l'enfant. L'importance à long terme de la sélection de cette résistance n'est pas entièrement connue.

1.7.2.4. Accouchement prématuré

Plusieurs études rapportent une augmentation du risque d'accouchement prématuré chez les femmes traitées en Europe (Lorenzi et al. 1998; Thorne et al. 2004). Néanmoins, les données provenant de sept grandes études, incluant les femmes enceintes infectées par le VIH, ne révèlent aucun risque significatif d'accouchement prématuré (Tuomala et al. 2002).

1.7.2.5 Effet d'une exposition *in-utero* aux antirétroviraux

On commence à en connaître un peu plus sur les effets à court et à long terme des agents antirétroviraux, utilisés dans la prévention de la transmission maternofoetale du VIH-1. Chez l'humain et le macaque rhésus l'AZT a la capacité de traverser la barrière placentaire, et d'être incorporé rapidement dans l'ADN du tissu placentaire de manière dose dépendante (Poirier et al. 1999; Olivero et al. 1999a; 1999b). Une étude française, réalisée auprès d'enfants exposés mais non infectés, a montré qu'en plus de l'anémie macrocytaire réversible, l'AZT avait un petit effet sur l'hématopoïèse qui pouvait persister jusqu'à l'âge de 18 mois (Le Chenadec et al. 2003). Par ailleurs, l'exposition intra utérine à l'AZT et à la lamivudine a été associée à des lésions mitochondriales chez les enfants (Poirier et al. 2003; Divi et al. 2004). De la même manière, un risque de syndrome neurologique associé à la persistance d'un dysfonctionnement mitochondrial a été rapporté chez des enfants exposés aux analogues nucléotidiques (Blanche et al. 1999; Barret et al. 2003). Il est intéressant de voir qu'un tel phénomène n'a pas été observé au cours d'une étude analogue (The Perinatal Safety Reviews Working Group, 2000). Enfin, des cas d'acidose lactique ont été découverts chez les enfants exposés à la HAART *in-utero* ou à l'AZT après la naissance (Alimenti et al. 2003).

1.7.2.6. Transmission à l'enfant en présence de charges virales faibles

Une importante limite de la thérapie dans la prévention de la transmission du VIH-1 à l'enfant réside dans la survenue de cas de transmission à l'enfant chez des femmes traitées ayant une charge virale <1000 copies/ml ou même indétectable (Sperling et al. 1996; Cao et al. 1997b; Ioannidis et al. 2001). Cette situation revêt une importance particulière dans les pays développés, où de nombreuses femmes enceintes ont de faibles charges virales consécutivement à la thérapie antirétrovirale.

1.7.3. Nouvelles stratégies

L'accumulation des résistances aux agents antirétroviraux, la toxicité de la thérapie antirétrovirale à long terme, la courte demi-vie de certains antirétroviraux (Moore et al. 1999; Mobley et al. 1999), qui limitent l'efficacité à long terme des prophylaxies antirétrovirales, et l'inaccessibilité au traitement dans les régions endémiques, soulignent l'urgence de développer des approches alternatives pour renforcer la prévention mère-enfant du VIH. La vaccination et/ou l'immunothérapie pourraient représenter des stratégies plus attractives pour les femmes enceintes et les nouveaux nés, et constituer de ce fait le fondement d'une protection à vie contre l'infection au VIH-1 (Safrit et al. 2004).

1.7.3.1. Immunisation passive

Les anticorps sont clairement impliqués dans la protection contre un certain nombre de maladies infectieuses. Il existe une corrélation entre les anticorps et la protection chez les enfants vaccinés contre l'hépatite B, l'*Haemophilus influenzae* B, la diphtérie et le tétanos, et ces vaccins restent parmi les plus efficaces. De nombreuses données indiquent l'efficacité des anticorps anti-VIH pour prévenir la transmission mère-enfant. Une corrélation positive a été mise en évidence entre la présence d'anticorps dirigés contre les épitopes de la protéine d'enveloppe gp120, incluant la boucle V3, et une faible transmission

de la mère à l'enfant (Rossi et al. 1989; Ugen et al. 1992; 1993b; Scarlatti et al. 1993a; 1997). Cependant, les données les plus récentes contestent cette corrélation (Guevara et al. 2002; Barin et al. 2006; Wu et al. 2006).

Les effets de l'administration passive d'un pool d'anticorps provenant de personnes infectées capables de neutraliser des isolats primaires de VIH-1 (immunoglobulines hyperimmunes (HIVIG)) ont été évalués mais les résultats n'étaient pas significatifs: l'incidence de la transmission du VIH-1 à l'enfant était faible car les femmes recevaient également de l'AZT (Stiehm et al. 1999). Un indice qui sous-tend l'importance de la réponse humorale dans la prévention de la transmission du VIH à l'enfant provient d'études réalisées sur les singes. L'administration passive d'une triple ou quadruple combinaison d'anticorps monoclonaux humains (1b12, 2G12, 2F5 et 4E10), dirigés contre les épitopes situés à la surface de gp120 (1b12 et 2G12) ou proche du domaine transmembranaire de l'enveloppe du VIH (2F5 et 4E10) (Wu et al. 2006), entraîne une protection complète de macaques rhesus (*Macaca mulatta*) nouveaux-nés contre le SIV reçu par voie orale (Baba et al. 2000; Hofmann-Lehmann et al. 2001; Ferrantelli et al. 2003). Il s'agit d'un modèle de animal qui mime l'exposition des muqueuses du nouveau-né humain au VIH dans le canal vaginal, lors de l'allaitement, ou lors de l'accouchement (Baba et al. 1994; Wu et al. 2006).

1.7.3.2. Vaccination

La contribution des réponses immunitaires cellulaires, et en particulier celles médiées par les LTC $CD8^+$, qui contribuent au contrôle de la réplication du VIH-1 et modulent la transmission mère-enfant du VIH, sera décrite dans la section 1.8. L'avantage de la réponse LTC, comparée à la réponse anticorps, est qu'elle reconnaît des peptides provenant à la fois des protéines de surface et les protéines internes non structurales du virus. De plus, une fois qu'elle est stimulée par les cellules présentatrices d'antigènes, la réponse LTC mène rapidement à la production des facteurs solubles, comme les beta

chimiokines MIP (Macrophage Inflammatory Protein)-1 α , MIP-1 β et RANTES, pouvant empêcher l'entrée du VIH-1 dans les cellules *in vitro* (Wagner et al. 1998; Price et al. 1998; Stranford et al. 1999). Ainsi, dans des conditions favorables, les LTC peuvent prévenir l'expansion du VIH-1 mais aussi l'établissement d'une infection généralisée en éliminant les cellules infectées initialement.

Les vaccins à base d'épitopes LTC représentent une approche logique pour générer une immunité cellulaire effective dans un cadre prophylactique ou thérapeutique. En effet, plusieurs épitopes peuvent être incorporés dans un vaccin afin d'induire une variété de réponses réactives dirigées contre les différents déterminants. Les approches vaccinales qui permettent l'utilisation d'un grand nombre d'épitopes LTC incluent les plasmides à ADN et les vecteurs viraux. Les études utilisant d'autres modèles de pathogènes ont montré que les vaccins à base de plasmides à ADN, exprimant des épitopes LTC minimaux, peuvent être utilisés simultanément afin d'induire les réponses LTC contre des épitopes multiples (Thomson et al. 1998; Yu et al. 1998; An et al. 2000). Les résultats obtenus avec les modèles animaux d'infection par le VIH-1 sont prometteurs. Les travaux réalisés sur les macaques rhésus immunisés avec des plasmides ADN exprimant les protéines du virus d'immunodéficience simien (SIVmac), ou des particules virales non replicatives SIVmac239, ont donné des résultats concluants (Lu et al. 1996; Barouch et al. 2000). De la même manière, une réponse cellulaire et des anticorps ont été observés chez les femelles chimpanzé immunisées avec des plasmides à ADN durant la grossesse (Bagarazzi et al. 1999). Cependant, l'immunisation de femmes enceintes avec des glycoprotéines d'enveloppe recombinantes dans le cadre d'un essai clinique randomisé n'a entraîné aucune protection contre la transmission mère-enfant du VIH-1, en dépit du succès des tests d'innocuité (Lambert et al. 1998; Wright et al. 1999).

1.7.4. Autres moyens de prévention

1.7.4.1. Césarienne électorive

Des particules virales peuvent être isolés à partir de sécrétions vaginales chez 30% à 40% des femmes infectées (John et al. 1997). Il convient donc de minimiser l'exposition du nouveau-né aux sécrétions maternelles durant l'accouchement. La césarienne électorive, pratiquée avant le début du travail et la rupture des membranes, réduit jusqu'à 25% le risque de transmission (Landesman et al. 1996). Les résultats d'une étude clinique randomisée ont montré une diminution de 50% de ce risque, comparé à l'accouchement vaginal. On recommande ainsi la pratique de la césarienne dans les pays en voie de développement où l'accès à la thérapie antirétrovirale reste difficile (Dominguez et al. 2003). L'efficacité de la césarienne électorive a été confirmée chez des femmes ayant une faible charge virale et chez celles ayant été traitées au moyen de thérapie antirétrovirale combinée (Ioannidis et al. 2001). Cependant, deux études européennes faisant cas de l'augmentation de la morbidité et des complications chez les femmes infectées par le VIH après la césarienne ont soulevé la question de l'évaluation des risques et des bénéfices de la césarienne dans ces circonstances (Ferrero and Bentivoglio 2003; Fiore et al. 2004).

1.7.4.2. Intervention locale

La désinfection vaginale à l'aide d'agents virucides, comme le gluconate de chlorhexidine avant l'accouchement ainsi que le lavage du nouveau né, ont été utilisés mais leur efficacité à réduire la transmission mère-enfant du VIH-1 n'a pas été démontrée (Biggar et al. 1996). Toutefois, cette intervention a été associée à une réduction significative du taux de transmission chez les femmes dont la période de rupture des membranes excédait 4 heures (Biggar et al. 1996; Gaillard et al. 2001).

1.7.4.3. Allaitement sous certaines conditions

Concernant la transmission *post-partum*, il est recommandé de prévenir les lésions des mamelons et les mastites, de réduire la durée de la période de l'allaitement et d'éviter l'allaitement pour les femmes à haut risque (Embree et al. 2000).

1.8. Lymphocytes T cytotoxiques

1.8.1. Mécanisme d'action

Les LTC CD8⁺ sont essentiels pour la suppression de la réplication virale et leur rôle central dans le contrôle de la progression de l'infection par le VIH-1 a est bien établi (Koup et al. 1994; Borrow et al. 1994; Borrow et al. 1997; Goulder et al. 1997; Matano et al. 1998; Brodie et al. 1999). L'activité cytotoxique des LTC CD8⁺ est médiée par deux mécanismes différents : la lyse directe des cellules infectées par le virus et la sécrétion de facteurs solubles antiviraux.

La lyse des cellules infectées par les LTC est initiée par la reconnaissance de l'antigène associé aux molécules de classe I du CMH de la cellule cible. Cette reconnaissance va induire une série d'évènements qui vont aboutir à l'activation des voies granule-dépendantes et granule-indépendantes. Dans le premier cas, la perforine et les granzymes, qui médient la mort de la cellule cible, sont libérées par exocytose. La perforine forme les pores dans la membrane de la cellule cible, ce qui facilite l'entrée des granzymes. Les granzymes induisent la mort par apoptose de la cellule infectée en provoquant indirectement la fragmentation de son ADN. Dans le deuxième cas, des molécules comme Fas (CD95) et TNF α (Tumor Necrosis Factor), non contenues dans les granules des LTC, initient l'apoptose dans la cellule infectée (Berke 1994; Henkart et al. 1995; Kagi et al. 1996).

1.8.2. Facteurs affectant l'activité des LTC chez les personnes infectées par le VIH

Bien que les LTC exercent une vigoureuse force sélective sur le VIH-1, plusieurs études publiées récemment révèlent que le contrôle de l'infection est incomplet (Jost et al. 2002; Altfeld et al. 2002; Addo et al. 2003). L'incapacité des LTC à irradiquer le VIH *in vivo* indique que ce virus a développé des mécanismes pour limiter l'efficacité de la réponse à médiation cellulaire.

1.8.2.1. Régulation négative de l'expression des molécules du CMH-I

L'un des mécanismes d'évasion de la réponse immunitaire implique la protéine Nef du VIH-1, qui protège la lyse des cellules infectées par les LTC en diminuant l'expression des molécules du CMH de classe I à leur surface (Collins et al. 1998). Nef évite la destruction des cellules infectées par les cellules NK (Natural Killer) en ciblant préférentiellement les allèles HLA-A et HLA-B du CMH-I, impliqués dans la présentation de l'antigène aux LTC, et non les HLA-C et HLA-E qui inhibent l'activité des NK (Le Gall et al. 1998; Cohen et al. 1999). Par ailleurs, Nef n'affecte pas la capacité des LTC à produire les cytokines qui inhibent la propagation du VIH-1 en culture (Tomiyama et al. 2002). Ainsi, les LTC contrôlent partiellement l'infection par le VIH en sécrétant les cytokines inhibitrices, mais n'éliminent pas totalement l'infection parce qu'elles sont incapables de lyser efficacement les cellules infectées.

La capacité de Nef à moduler négativement l'expression du CMH-I semble être importante dans la pathogenèse de la maladie *in vivo*. En effet, l'intégrité du gène *nef* est nécessaire à la progression de la maladie vers le stade SIDA, tant chez le chimpanzé que chez l'humain (Kestler et al. 1991; Kirchhoff et al. 1995; Deacon et al. 1995). Les mutations de *nef*, qui inhibent sa capacité à réduire l'expression du CMH-I reviennent rapidement au type sauvage *in vivo* (Munch et al. 2001). Plus encore, les allèles de *nef*

isolés au début de la maladie semblent avoir été sélectionnés pour leur capacité à réguler l'expression du CMH-1, alors que les allèles moins compétents en la matière sont plus fréquemment isolés tard dans la maladie (Carl et al. 2001).

1.8.2.2. Densité des protéines virales à la surface des cellules infectées

Les LTC identifient les cellules infectées en reconnaissant les complexes CMH-1-peptides à leur surface. Une perturbation affectant l'expression des protéines virales peut altérer la reconnaissance par les LTC en réduisant la quantité de peptides disponibles. Effectivement, on a rapporté que la densité des épitopes Gag à la surface des cellules infectées est un facteur plus important que l'affinité des récepteurs T (RcT) pour le contrôle de la réplication du VIH par les LTC (Tsomides et al. 1994; Yang et al. 2003).

Une autre étude récente a souligné l'importance de la densité des épitopes en examinant l'effet de l'activité de la protéine Rev du VIH sur la reconnaissance des cellules infectées par les LTC (Bobbitt et al. 2003). La fonction de Rev est de promouvoir la sortie du noyau des ARN messagers des gènes tardifs (*gag, env, pol, vpu, vpr et vif*), permettant ainsi leur expression. Ainsi, le niveau d'activité de Rev détermine le niveau d'expression relatif des protéines tardives. De manière intéressante, la capacité des LTC à reconnaître les cellules infectées varie en fonction de l'activité de Rev. De plus, le niveau d'activité de Rev est sélectionné par la réponse immunitaire : les allèles de *rev* les moins actifs sont plus abondants en début de maladie, quand le système immunitaire est encore fonctionnel, alors que les allèles les plus actifs émergent plus tard, quand le système immunitaire a été compromis.

1.8.2.3. Variation antigénique

La variation antigénique est un élément important qui permet au VIH d'échapper à la réponse LTC. En effet, la capacité qu'a le VIH de muter les épitopes LTC, suite à la pression sélective de la réponse LTC VIH-spécifique, est très bien documentée (Phillips et

al. 1991; Borrow et al. 1997; Goulder et al. 1997; Soudeyns et al. 1999; Geels et al. 2003; Jones et al. 2004). L'importance des épitopes viraux restreints au CMH-1 est renforcée par l'existence des allèles protecteurs du CMH-1, HLA-B*57 et HLA-B*63, associés à un meilleur contrôle de la charge virale et à une lente progression de la maladie (Kiepiela et al. 2004; Frahm et al. 2005). De plus, l'adaptation du VIH aux réponses HLA-restreintes au niveau populationnel a été mise en évidence par Moore et ses collaborateurs. Ils ont démontré que la présence ou non des polymorphismes au niveau des épitopes LTC du VIH était spécifique des allèles HLA (Moore et al. 2002).

1.8.2.4. Effet pro apoptique des protéines virales

Un autre mécanisme utilisé par le VIH est d'induire l'augmentation du turnover des LTC VIH-spécifiques. Des études réalisées chez l'homme et les macaques démontrent que la protéine Nef est capable de réguler de façon positive l'expression de Fas ligand (FasL), impliqué dans la mort cellulaire programmée, sur les cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Nef limite donc la réponse LTC en induisant l'apoptose de ces cellules (Katsikis et al. 1995; Mitra et al. 1996; Xu et al. 1997; Bahr et al. 1997).

De manière analogue, la protéine Env des virus CXCR4-tropiques régule de façon positive l'expression du récepteur TNF sur les LTC et celle de TNF α sur les macrophages. Ainsi, le contact direct entre ces deux types de cellule induit alors l'apoptose des LTC (Herbein et al. 1998).

1.8.2.5. Défaut de maturation des LTC

Il existe un certain nombre d'évidences qui indiquent que les LTC VIH-spécifiques fraîchement isolées des personnes infectées par le VIH sont fonctionnellement anormales. D'abord, ces cellules n'expriment pas les marqueurs de différenciation CD45R et CCR7 (Champagne et al. 2001). Ensuite, comparées aux LTC anti-CMV, les LTC VIH-spécifiques ont une faible expression de la perforine (Anderson 1999; Appay et al. 2000).

Des études supplémentaires seront requises afin de déterminer si ce défaut de maturation résulte de la perte des cellules auxiliaires T CD4⁺ chez les personnes infectées au VIH-1.

1.8.2.6. Déplétion des cellules T auxiliaires CD4⁺ anti-VIH

Les cellules T CD4⁺ anti-VIH, nécessaires à la différenciation finale des LTC VIH-spécifiques, sont rapidement perdues après l'infection compromettant ainsi la réponse LTC (Rosenberg et al. 1997). Ce qui peut s'expliquer par la susceptibilité de ces cellules à l'infection par le VIH (Douek et al. 2002). Par ailleurs, Plusieurs travaux viennent de mettre en évidence l'implication de PD (pour programmed death)-1 et son ligand (PD-L1) dans l'incapacité des cellules T CD8⁺ VIH-spécifiques à produire des cytokines suite à la stimulation (aussi appelée l'«exhaustion» des cellules T), et la progression de la maladie (Trautmann et al. 2006; Petrovas et al. 2006; Day et al. 2006). En effet, il en ressort que : a) PD-1 est un régulateur de la survie des cellules T CD8⁺ VIH-spécifiques; b) que le blocage de sa liaison avec son ligand PD-L1 augmente la survie et la prolifération de ces cellules, ce qui se traduit par une restauration de la fonction cytotoxique.

1.8.3. Rôle dans le contrôle de la réplication virale

Le principal mécanisme de défense qui restreint la réplication du VIH-1 et interfère avec la progression de l'infection au VIH-1 est la réponse LTC VIH-spécifiques. De nombreuses évidences démontrent l'implication de ces cellules dans le contrôle de la charge virale et la progression de la maladie chez les patients infectés: a) pendant la phase aiguë de l'infection, l'apparition des LTC VIH-spécifiques est fortement associée à la baisse de la virémie (Koup et al. 1994; Greenough et al. 1997; Ogg et al. 1998). Une relation temporelle entre les mutants échappant à l'activité LTC, la diminution de la fréquence des LTC VIH-spécifiques et la perte du contrôle de la réplication virale a également été établie chez l'homme (Oxenius et al. 2004); b) comparés aux progresseurs, les personnes asymptomatiques à long terme ont des niveaux d'activité LTC VIH-

spécifique très élevés (Pantaleo et al. 1995; Klein et al. 1995; Dyer et al. 1999); c) la diminution graduelle du nombre de ces cellules provoque une rapide progression vers le stade SIDA (Klein et al. 1995; Kvale et al. 1999); d) les cellules CD8⁺ VIH-spécifiques exercent une pression de sélection qui conduit à l'apparition de variants viraux capables d'échapper à la réponse immunitaire (Borrow et al. 1997; Price et al. 1997; Soudeyins et al. 1999); e) Les macaques rhésus déplétés en cellules T CD8⁺ et infectés par l'isolat SIV_{mac251} du virus de l'immunodéficience simien (VIS), ont une virémie élevée de façon persistante et progressent rapidement vers la maladie (Schmitz et al. 1999). À cela il faut rajouter la détection des réponses LTC chez les partenaires sexuels des personnes infectées par le VIH-1 (Mazzoli et al. 1997; Goh et al. 1999), l'association des types rares de molécules d'HLA aux faibles virémies (Altfeld et al. 2003), et l'association entre l'hétérozygotie pour les molécules d'HLA et un meilleur état clinique (Carrington et al. 1999). Les réponses LTC ciblant les protéines Gag et Nef du VIH-1 ont été associées à un meilleur contrôle de la charge virale (Haas et al. 1996; Masemola et al. 2004) et à une protection contre l'infection par le VIH et le VIS (Gallimore et al. 1995; Patke et al. 2002), respectivement.

Par ailleurs, il a été rapporté que l'induction des réponses LTC VIS-spécifiques, par la vaccination, contribuait au contrôle de la réplication du SIV et des pathogènes associées dans plusieurs études indépendantes (Amara et al. 2001; Barouch et al. 2001; Horton et al. 2002; Shiver et al. 2002). Enfin, l'efficacité du contrôle des LTC a été renforcée par la découverte que les mutants SIV, ayant des altérations dans des épitopes LTC immunodominants pouvaient échapper à la reconnaissance par les LTC, et que cela se traduisait par une augmentation de la réplication virale et une progression rapide de la maladie (Allen et al. 2000; Barouch et al. 2002; Nacsa et al. 2003).

1.8.4. Implication dans la transmission mère-enfant du VIH-1

1.8.4.1. Réponse LTC durant la grossesse

De nombreuses études ont été consacrées aux modifications du nombre total et du pourcentage de différentes populations de cellules leucocytaires dans le sang périphérique pendant la grossesse. Des données contradictoires en ressortent. Par exemple, certaines études associent la grossesse à une diminution (Matthiesen et al. 1995) ou une augmentation (Kuhnert et al. 1998) du nombre de cellules T cytotoxiques CD8⁺, alors que d'autres ne trouvent aucune association (Fiddes et al. 1986). Des disparités existent aussi concernant les cellules T auxiliaires CD4⁺ : une diminution (Watanabe et al. 1997) ou absence de changement (Sabahi et al. 1995; Kuhnert et al. 1998) ont été rapportées durant la grossesse.

Toutefois, la majorité des études portant sur la fonction des lymphocytes T chez la femme enceinte ont démontré un défaut de prolifération et de sécrétion de l'interferon- γ (IFN- γ) et de l'interleukine-2 (Il-2), après stimulation *in vitro* par la concanavaleine A (ConA), la phytohemoagglutinine (PHA) ou des antigènes (Lederman 1984; Sabahi et al. 1995; Matthiesen et al. 1996). Une suppression de l'activité des LTC contre les infections virales (Gehrz et al. 1981; Kumar et al. 1984) et certains pathogènes intracellulaires, dont *Plasmodium falciparum* (Riley et al. 1989), a été également observée durant la grossesse. Par ailleurs, une autre évidence renforçant la suppression de l'immunité à médiation cellulaire durant la grossesse, est la rémission de l'arthrite rhumatoïde et les scléroses en plaques, deux maladies autoimmunes médiées par les cellules T, chez la majorité des femmes enceintes atteintes de ces affections (Al-Shammri et al. 2004). Inversement, la fonction des lymphocytes B et la production des anticorps sont maintenues et même augmentées durant la grossesse (Watanabe et al. 1997; Narita et al. 2000).

Un certain nombre de facteurs ont été proposés pour expliquer l'immunomodulation de l'activité des cellules T durant la grossesse. Il ne fait aucun doute que le succès d'une grossesse dépend de la capacité qu'a le système immunitaire de la mère de tolérer le fœtus qui, immunologiquement parlant, est un allogreffe du fait de l'expression des antigènes foeto-paternels (Zuckermann and Head 1987). De nombreuses études rapportent l'expression préférentielle durant la grossesse des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-10) qui renforcent l'immunité humorale et sont communément associées au phénomène de tolérance. Alors que, la synthèse des cytokines de type 1, qui activent les réponses cytotoxiques et sont associées au phénomène de rejet, comme l'INF- γ , le TNF- α et l'IL-2 est réprimée (Wegmann et al. 1993; Marzi et al. 1996; Shimaoka et al. 2000; Raghupathy 2001). Par ailleurs, la production d'IL-2, qui active l'activité cytotoxique des LTC, au cours de la grossesse a été associée à l'interruption de la grossesse (Raghupathy 1997; Reinhard et al. 1998). Ainsi, la polarisation de la production des cytokines vers le type 2 pourrait favoriser le maintien de la grossesse.

D'autres part, la plupart des travaux menés sur les lymphocytes T durant la grossesse y ont rapporté une diminution de l'activité LTC (Santoli et al. 1976; Watanabe et al. 1997). Cela pourrait expliquer, du moins en partie, l'augmentation de la susceptibilité des femmes enceintes aux infections virales et aux pathogènes intracellulaires (Reinhardt 1979; Unanue 1997).

Certaines hormones dont la production est élevée durant la grossesse semblent être impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire chez la femme enceinte. En effet, les corticostéroïdes et la progesterone ont la capacité de favoriser la production des cytokines de type 2 (Piccinni et al. 1995). Par ailleurs, l'implication de ces hormones est soutenue par la rémission de la sclérose en plaques des femmes non gestantes traitées avec de l'estriol, une hormone sécrétée durant la grossesse (Sicotte et al. 2002).

1.8.4.2. Réponse LTC et Transmission verticale du VIH

Plusieurs études soutiennent l'implication des LTC dans la modulation de la transmission mère enfant du VIH : a) il a été montré que les femmes qui ne transmettent pas le VIH-1 à leur enfant avaient de fortes réponses LTC VIH-spécifiques, contrairement à celles qui transmettent (Jin et al. 1998; Plaeger et al. 1999); b) les femmes qui ne transmettent pas le VIH ont des fréquences élevées des précurseurs de LTC dirigés contre les protéines Nef et Pol du VIH-1 durant la grossesse (Jin et al. 1998); c) les LTC VIH-spécifiques sont plus souvent détectés chez les enfants non infectés nés de mères infectées (Da Silva and Spector 1992; Cheynier et al. 1992; Rowland-Jones et al. 1993; De Maria et al. 1994); et d) les variants viraux échappant à la réponse LTC, sont sélectivement transmis de la mère à l'enfant (Wilson et al. 1999; Pillay et al. 2005). Malgré cela, on ne connaît que peu de choses de l'histoire naturelle et de la dynamique de la réponse LTC VIH-spécifique durant la grossesse et encore moins sur l'effet de l'introduction de la HAART sur cette réponse.

1.8.5. Effet de la thérapie antirétrovirale

1.8.5.1. Réduction de l'oligoclonalité des LTC VIH-spécifiques

Avec l'avènement de la thérapie antirétrovirale, l'une des questions majeures est de savoir comment améliorer l'ensemble du système immunitaire chez les personnes infectées au VIH-1 recevant la thérapie antirétrovirale combinée (HAART). Il a été montré que la HAART induit le déclin de l'immunité cellulaire VIH spécifique chez les patients (Ogg et al. 1999; Pitcher et al. 1999; Soudeyns et al. 2000). En effet, les études menées sur l'effet de la HAART sur la diversité du récepteur des lymphocytes T (RcT) montrent que le contrôle de la virémie entraîne une réduction de l'oligoclonalité des LTC VIH-spécifiques (Gray et al. 1998; Soudeyns et al. 2000; Romiti et al. 2001). Il semble aussi que la HAART

favorise la sélection et l'expansion de nouveaux clones de LTC VIH-spécifiques dont certains ne sont pas immunodominants (Soudeyns et al. 2000).

1.8.5.2. Réduction de l'activité cytolytique des LTC

Par ailleurs, Trabattoni et *al.* ont rapporté récemment la réduction de l'activité cytolytique des LTC VIH-spécifiques, se traduisant par une expression faible de la perforine et de granzyme, chez les personnes infectées traitées. Ils ont suggéré une interférence directe des agents antirétroviraux avec la synthèse de ces deux protéines, ce qui selon eux, contribuerait en partie à la détérioration de la réponse LTC observée chez les patients sous HAART (Trabattoni et al. 2004).

1.9. Objectifs

1.9.1. Article 1

L'étude de la prévalence des sous types du VIH-1 chez les femmes enceintes peut constituer une source importante d'informations sur les différentes clades du VIH-1 qui circulent dans la population. Comme décrit précédemment, de nombreux cas d'infections par les sous types non-B du VIH-1 ont été rapportés en Europe et en Amérique (Fransen et al. 1996; Alaeus et al. 1997; Boni et al. 1999; Weidle et al. 2000; Couturier et al. 2000; Esteves et al. 2002; Chaix et al. 2003). Cependant, peu de données existent sur l'introduction des variants non-B au Canada. De manière à évaluer la proportion des différents sous types viraux à Montréal, nous avons entrepris de déterminer la diversité génétique du VIH-1 dans une cohorte multiethnique de femmes enceintes infectées par le VIH. La dissémination des infections par les variants non-B dans le monde est directement

liée aux mouvements de population à partir de régions à forte prévalence de souches non-B, principalement l'Afrique Sub-Saharienne et Asie du Sud-Est. Nous avons donc cherché à établir une association entre les clades qui prédominent dans les pays d'origine des patientes et les variants identifiés dans notre cohorte.

1.9.2. Article 2

Il n'y a aucun doute quant au rôle majeur joué par les LTC VIH-spécifiques dans le contrôle de la charge virale et le ralentissement de la progression de la maladie chez les patients infectés. De plus, de nombreuses données citées ci-dessus (voir section 1.8.3) supportent l'implication des LTC dans la modulation de la transmission mère enfant du VIH bien que la plus part des études menés sur les lymphocytes T durant la grossesse ont rapporté une diminution de l'activité LTC (Santoli et al. 1976; Watanabe et al. 1997). Afin de palier à l'absence de données sur l'activité cytotoxique des LTC chez la femme enceinte, nous avons pris en charge de caractériser pour la première fois les réponses LTC VIH-spécifiques durant la grossesse et l'intervalle intergénéral (i.e. la période de temps entre la fin d'une grossesse et le début d'une autre) chez la femme infectée.

La thérapie antirétrovirale administrée aux femmes infectées par le VIH durant la grossesse vise à diminuer la charge virale du VIH, ce qui contribue, non seulement à améliorer leur qualité de vie mais aussi à réduire le risque de transmission du VIH au nourrisson. Or, ce traitement affecte l'immunité cellulaire VIH-spécifique en réduisant entre autre l'oligoclonalité et l'activité cytolytique des LTC VIH-spécifiques chez les patients. C'est pourquoi nous avons également évalué l'influence de la thérapie antirétrovirale sur les réponses LTC VIH-spécifiques durant la grossesse.

Finalement, nous avons pris avantage de la diversité génétique des souches infectieuses représentées au sein de notre cohorte afin d'estimer l'importance des réponses LTC VIH-spécifiques cross-réactives durant la grossesse.

1.9.3. Article 3

L'implication des sous types viraux maternels dans la transmission verticale du VIH peut se comprendre par la progression rapide de la maladie chez les femmes infectées par certaines clades du VIH-1 (Kanki et al. 1999; Kaleebu et al. 2002). Par ailleurs, certains variants viraux ont une capacité accrue à développer de la résistance à certaines classes d'agents antirétroviraux (voir section 1.5.6.2). Plus intéressant encore, le type de variants maternels transmis semble dépendre du moment de la contamination, les variants majeurs étant préférentiellement transmis *in utero*, alors que les variants mineurs sont préférentiellement transmis *intrapartum* (Dickover et al. 2001; Verhofstede et al. 2003). Comme peu d'études ont été consacrées à l'évolution génétique du VIH-1 pendant la grossesse, nous nous sommes intéressés non seulement à la diversité et à l'évolution génétique du gène *env* du VIH-1 durant la grossesse et l'intervalle intergénéral, mais aussi à l'effet de la thérapie antirétrovirale sur cette évolution. L'évolution génétique étant un marqueur indirect de la dynamique de la réponse immunitaire anti-VIH.

1.10. Contribution personnelle aux différents articles

1.10.1. Article 1

Pour cet article, qui porte sur la diversité génétique du VIH-1 dans une cohorte anténatale: j'ai coordonné la mise au point des différents protocoles de RT-PCR (du design des amorces aux différents ajustements des paramètres) par différents stagiaires qui travaillaient sous ma supervision (Kathy Deroy, Natacha Merindol). Je me suis occupé à la fois du recrutement des patientes du groupe d'étude, de la collecte et de la compilation des données cliniques, du génotypage des isolats viraux, des extractions d'ARN à partir d'échantillons de sérum, et du suivi du bon déroulement des travaux de recherche. Enfin, j'ai réalisé l'ensemble des analyses phylogénétiques et écrit l'article.

1.10.2. Article 2

J'ai été la principale investigatrice de ce travail consacré à l'activité VIH-spécifique des LTC durant la grossesse. Ma participation concernait à la fois le recrutement des femmes enceintes infectées par le VIH-1, l'amplification des virus *vaccinia* exprimant les différentes protéines du VIH-1, la mise au point des protocoles de clonage des lymphocytes T à partir des PBMC de patiente, la génération des lignées des lymphocytes B transformés par le virus EBV, et le test de relargage de ^{51}Cr . Par la suite, j'ai effectué la compilation et l'analyse des données cliniques et moléculaires ainsi que tous les tests statistiques avant d'écrire le manuscrit.

1.10.3. Article 3

J'ai été à l'origine de ce projet, qui traite de la diversité et de l'évolution du gène *env* durant la grossesse, dont j'ai écrit les grandes lignes. Après avoir sélectionné les participantes à cette étude, j'ai été en charge des extractions d'ARN à partir d'échantillons de sérum, j'ai mis au point les différents protocoles de nested RT-PCR et j'ai supervisé les travaux d'une stagiaire (Natacha Merindol) avec laquelle j'ai travaillé en étroite collaboration dans la génération des résultats. Je me suis ensuite chargée de l'ensemble des analyses bioinformatiques et statistiques ainsi que de l'écriture du manuscrit.

Article 1

HIV-1 Genetic Diversity in Antenatal Cohort, Canada

Bertine S. Akouamba,*† Janique Viel,* Hugues Charest,‡ Natacha Merindol,*† Johanne Samson,* Normand Lapointe,*† Bluma G. Brenner,§ Richard Lalonde,¶ P. Richard Harrigan,# Marc Boucher,*† and Hugo Soudeyns*†

We studied HIV genetic diversity in a cohort of 127 pregnant, HIV-infected women who received prenatal care at Sainte-Justine Hospital in Montreal, Canada, between 1999 and 2003. Clade assignments were derived by phylogenetic analysis of amplified *pol* sequences. Genotyping was successful in 103 of 127 women, 59 (57.3%) of whom were infected with clade B HIV-1, and 44 (42.7%) with non-clade B viruses, including subtypes A, C, D, F, G, and H. Four sequences remained unassigned. Forty-three of 44 women infected with non-clade B viruses were newcomers from sub-Saharan Africa, and subtype identity was consistent with those circulating in their countries of origin. These results highlight the epidemiologic importance of non-B HIV-1 in antenatal populations in a large North American urban center, underscore the influence of population movements on clade intermixing, and identify a group of patients who could be targeted for surveillance and drug therapy followup.

HIV-1 exhibits considerable genetic diversity resulting from the high mutation rate of reverse transcriptase, high viral turnover, viral genomic recombination, and immune and therapeutic selection pressures (1–3). This diversity is a challenge for viral load determination, drug resistance testing, and AIDS vaccine development (1,4–6). Three phylogenetic groups of HIV-1, main (M), outlier (O), non-M, non-O (N), are recognized (2,7). Most HIV-1 infections are caused by group M viruses that comprise 9 clades (A–D, F–H, J, and K) and >13 intersubtype recombinants known as circulating recombinant forms (CRFs)

(8). Clade B is most common in North America, Europe, and Australia. However, in the last decade, prevalence of infection with nonclade B viruses has increased in France, Belgium, Spain, and Switzerland (9–12), in large part after migration from or international travel into HIV-endemic areas (13). Nonclade B viruses also circulate in Cuba (14) and the United States (15,16). We measured HIV-1 subtype diversity in a multiethnic cohort of pregnant, HIV-infected women to determine whether nonclade B HIV-1 is emerging in Canada after population movement, and whether antenatal cohorts are suitable sentinel sites to monitor the introduction of nonclade B viruses into Canada.

Patients and Methods

Patients

One hundred twenty-seven HIV-infected women receiving prenatal care at Centre Maternel et Infantile sur le SIDA, Sainte-Justine Hospital, Montreal, from October 1999 to September 2003 were included in the study. Inclusion criteria were 1) age ≥ 18 years, 2) a request for prenatal care, 3) positive HIV-1 serologic results, and 4) informed consent. Standardized clinical followup, including antiretroviral (ARV) prophylaxis and treatment, was provided to all women and their children. This cohort study was conducted according to the guidelines of the Ethics Review Board of Sainte-Justine Hospital.

Clinical Parameters

HIV-1 serologic status was determined by using the AxSYM HIV 1/2 gO method (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany) and confirmed by Western blot. HIV-1 viral load was measured by using the Versant HIV-1 RNA 3.0 assay (bDNA, Bayer, Pittsburgh, PA, USA). CD4+ T-cell counts were measured by flow cytometry. Standardized data collection assessed sociodemographic

*Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; †Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; ‡Institut National de Santé Publique du Québec, Sainte-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canada; §Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Quebec, Canada; ¶McGill University Health Center, Montreal, Quebec, Canada; #British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS, Vancouver, British Columbia, Canada

variables and previous and current ARV treatment. Numeric variables were compared by using the Kruskal-Wallis test. Categorical variables were examined by using the Fisher exact test (SPSS version 11.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

HIV-1 Genotyping

In cases in which viral load was >1,000 RNA copies/mL plasma, HIV-1 genotyping was performed by using a protocol (Virco BVBA, Mechelen, Belgium) based on sequencing of a 1,497-bp fragment of the HIV-1 *pol* gene (position 2253-3749). In cases in which viral load was <1,000 copies/mL, viral RNA was extracted from plasma, and a 524-bp *pol* segment (position 2597-3120) was amplified by using primers 3069R (5'-GGA TGG CCC AAA GGT TAA ACA-3') and 3591F (5'-ATC CTA CAT ACA AAT CAT CCA T-3') and the QIAamp 1-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). PCR conditions were 40 cycles consisting of 94°C for 30 s, 53°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by extension at 72°C for 10 min. Amplicons were cloned into pPCR-Script (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and sequenced by using dye terminator chemistry (Beckman-Coulter, Palo Alto, CA, USA).

Sequences were aligned with references (2001) representing different HIV-1 subtypes (<http://hiv-web.lanl.gov>) (8) by using Clustal X version 1.81 (17). Kimura 2-parameter distance matrices were assembled (transition/transversion ratio of 2) (18,19). Phylogenetic reconstructions were built according to the neighbor-joining method, and 1,000 bootstrap resamplings were performed to assess tree topology (MEGA version 2.1) (20). Clade assessment was based on reliable grouping (>80% bootstrap) with reference sequences (8). RIP version 1.9 (www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/RIPPER/rip_test.html) (21) was used to examine potential intersubtype recombinants, with gap stripping on, a window size of 200 characters, and a significance threshold of 90%.

Results

One hundred twenty-seven women 18.3–42.6 years of age (median 30.9, interquartile range [IQR] 7.2) were included in the study: 40 (31.5%) from North and Central America, 35 (27.6%) from the Caribbean, 1 (0.8%) from Asia, and 51 (40.2%) from sub-Saharan Africa. Median HIV-1 viral load at the time of inclusion in the study was 3.24 log RNA copies/mL of plasma (IQR 1.97) and median CD4+ cell count was 403 cells/ μ L (IQR 248). Of the 127 patients, 66 (52.0%) had not received ARV therapy before study inclusion, 8 (6.3%) had interrupted therapy, and 53 (41.7%) were treated with a regimen consisting of 1 ($n = 2$), 2 ($n = 9$), 3 ($n = 39$) or 4 ($n = 3$) ARV drugs.

The HIV-1 *pol* gene was successfully amplified and sequenced in 103 (81.1%) of 127 patients, a rate comparable with findings of other studies (22). Seventy-three results were obtained with the Virco procedure, and 30 were obtained with an alternative RT-PCR method. Unsuccessful amplification was associated with low viral load: patients with a viremia level of <500 copies/mL accounted for 23 (95.8%) of 24 in whom gene amplification was unsuccessful, in comparison with 27 (26.2%) of 103 in the rest of the study group ($p < 0.0004$, Fisher exact test). This is consistent with the finding that a larger proportion of patients with unsuccessful gene amplification were treated with ARV therapy at the time of inclusion in the study (75.0% versus 34.0%, $p < 0.0004$, Fisher exact test). Despite this limitation, sequence information was obtained in more than half of patients with a viremia level of <500 copies/mL (27/50), and in one third of patients with a viremia level of <50 copies/mL (8/24).

Phylogenetic analysis based on a 524-bp *pol* fragment (position 2597–3120) was used to identify the HIV-1 clade. In all cases, grouping based on the 524-bp fragment was consistent with that obtained when all available 1,497-bp sequences were analyzed separately (data not shown). In aggregate analysis, sequences derived from 59 (57.3%) of 103 patients formed a well-defined cluster with clade B reference sequences (Figure, left panel and data not shown). Of these 59 patients, 27 (45.8%) were of Canadian origin, 27 (45.8%) were from Haiti, 2 (3.4%) from Mexico, 1 (1.7%) from Jamaica, 1 (1.7%) from the Dominican Republic, and 1 (1.7%) from the United States. Phylogenetic overlap between these sequences was considerable, and bootstrap support for clustering based on country of origin was <50% (Figure, left panel).

In addition, 44 (42.7%) of 103 patients were infected with nonclade B viruses. Nine (20.5%) of the amplified sequences were similar to reference sequences from clade A, including CRF01-AE. Within this cluster, independent grouping of sequences derived from patients TV641, TV731, and TV783 was only supported by low bootstrap values (Figure, right panel). Sequences from 12 patients (27.3%) clustered alongside clade C references (93% bootstrap), with TV833 the distal taxon. Five (11.4%) grouped with clade D. Two (4.55%) grouped with clades F1 and F2, with TV633 closest to the CRF05-DF reference. One sequence (2.27%) grouped with clade H (99% bootstrap), and 11 (25.0%) with clade G. Among these, 8 sequences formed a well-supported CRF02-AG subcluster (97% bootstrap), while TV909 grouped closest to clade G reference (96% bootstrap). TV737 and TV695 formed a distinct G clade subcluster (100% bootstrap) (Figure, right panel). The 938-nucleotide (nt) fragments of the envelope (*env*) gene V1-V3 region were amplified, sequenced, and analyzed in samples from patients TV737 and TV695. These

RESEARCH

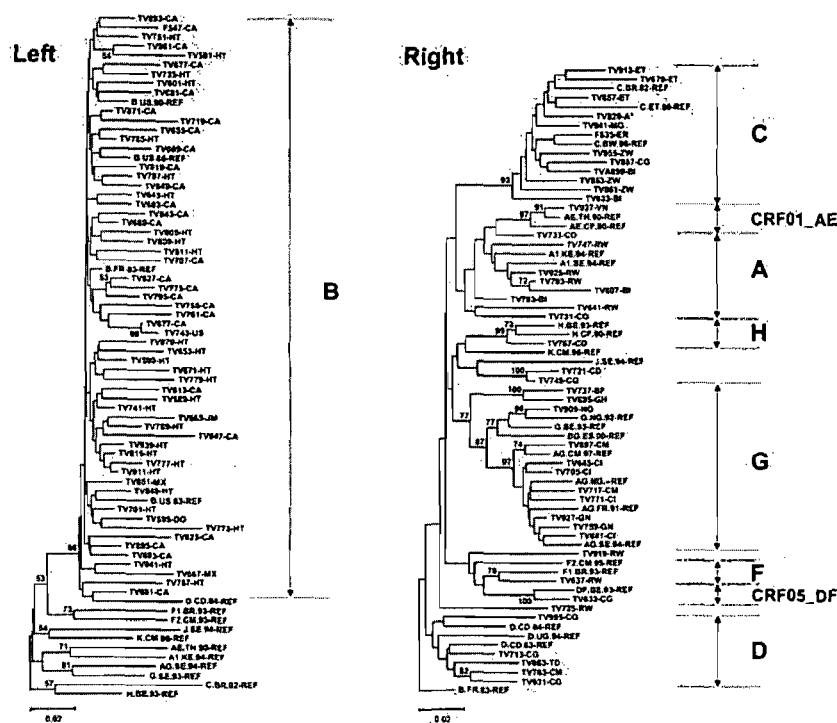


Figure. Phylogenetic analysis of pol sequences derived from pregnant women infected with HIV-1. Trees were constructed by using the neighbor-joining method as described in Patients and Methods. A transition/transversion ratio of 2 was used and 1,000 bootstrap resamplings were performed. Left panel: Subgrouping with clade B HIV-1. Right panel: Grouping with non-B HIV. Reference sequences (REF) were obtained from the Los Alamos National Laboratory database (2001) (8). The scale bar represents 0.02 nucleotide substitutions per site. Letter codes indicate country of origin. All nucleotide sequence information was submitted to GenBank (accession no. DQ059647-DQ059749). CRF, circulating recombinant form.

segments clustered closely with one another (96% bootstrap) but loosely with clade G references (41% bootstrap), which confirmed that these 2 isolates fall outside of the subtype G crown group (data not shown). Finally, TV721 and TV749 clustered loosely with the J reference (61% bootstrap), while TV725 and TV919 grouped outside major clades, although all belonged to the M group (100% bootstrap) as determined by phylogenetic analysis using group N, O, U, and SIVcpz alignments (8) (not shown).

In patients in whom the 1,497-nt sequences were available, the potential intersubtype mosaic nature of viruses with uncertain clade assignment was examined using RIP (21). This analysis indicated that TV731 and TV783 had significant homology with the A1 + A2 consensus, TV833 was homologous to the clade C reference, and TV737 and TV909 closely resembled the clade G consensus (>90% confidence), which confirmed initial assessments. The recombinant nature of TV633 was also supported, with significant homology to clades D and F (putative crossover at position 2795–2796), while TV695 showed highest resemblance to clade G in its 5′-terminal portion and clade C at the 3′ end (>90% confidence), with a potential breakpoint at position 3169–3170. In addition, TV721, TV725, TV749, and TV919 did not show significant homology with any of the sequences in the reference alignment, which prevented assessment of their putative intersubtype nature and their assignment to existing M group clades (Figure, right panel and data not shown). TV721 and TV749 were compared with HIV sequences in GenBank

using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). The closest homology to TV721 was isolate A2-225.692 from Uganda (23), with 92% identity over a 522-nt segment. The closest homology to TV749 was isolate 97CM.MP806 from Cameroon (24), with 89% identity over an 884-nt segment. When the 938-nt segments of the *env* gene VI-V3 region were amplified and sequenced, TV721 and TV749 clustered closely with one another (100% bootstrap) and with clade G and J references (92% bootstrap) (data not shown). This finding suggests that TV721 and TV749 represent either complex mosaic recombinants or a new subtype of the HIV-1 M group.

In all but 1 patient (43 [97.7%] of 44), those infected with nonclade B viruses were newcomers from Africa, including 34 (77.3%) asylum seekers. Nine patients originated from West Africa: Côte d'Ivoire (n = 4), Burkina Faso (n = 1), Guinea (n = 2), Ghana (n = 1), and Nigeria (n = 1). Twenty-five originated from central Africa: Congo (n = 7), Democratic Republic of Congo (n = 3), Rwanda (n = 7), Burundi (n = 4), Cameroon (n = 3), and Chad (n = 1). Four originated from East Africa: Ethiopia (n = 3) and Eritrea (n = 1). Four originated from southern Africa: Zimbabwe (n = 3) and Madagascar (n = 1). One patient declined to specify her country of origin. Geographic clustering was observed on the cladogram, with West African sequences grouping among clade G, and East and southern African sequences grouping with clade C. The highest HIV-1 genetic diversity was observed in patients from central Africa (Figure, right panel), as previously reported (25).

Median viral load and CD4+ cell count at the time of inclusion in the study were not significantly different in patients infected with clade B virus versus those infected with nonclade B virus, although more patients infected with clade B virus received ARV therapy. In patients not treated, median CD4+ cell count was 91 cells/ μ L lower in those infected with nonclade B virus, which suggests more advanced disease (Table). Comparison of duration of infection between subgroups was not possible.

Discussion

HIV-1 clade diversity was characterized among a cohort of HIV-infected women receiving prenatal care in a tertiary care hospital serving a cosmopolitan population. Results indicate that 59 (57.3%) of 103 patients in whom genotyping was successful were infected with clade B HIV-1. This finding is compatible with the wide circulation of clade B in North and Central America and the Caribbean, from which 40 (31.5%) and 35 (27.6%), respectively, of the 127 patients in our cohort originated, and the relatively high prevalence of HIV-1 infection among patients from Haiti in the Montreal area (1,26). Additionally, 42.7% of patients in whom genotyping was successful were infected with nonclade B viruses, a proportion much greater than the rate reported in 312 HIV-infected US blood donors (2%) (16) and in a recent Canadian public health surveillance report (8.9%) (27). To our knowledge, this is the highest prevalence of non-B HIV infection reported in any North American study group, including US military personnel (16,28,29). Sequences were identified that belonged to every clade of the HIV-1 M group except J and K. This level of genetic diversity was not previously reported in a North American study group, with the exception of the Centers for Disease Control and Prevention surveillance registry (22), and is as extensive as that observed in Cuba (14). Four of the *pol* segments obtained clustered ambiguously among reference sequences, which suggests that they represent either novel HIV-1 M group clades or complex recombinants.

However, additional characterization, including full-genome sequencing, would be required to settle this issue. Based on our results, infection with multiple HIV-1 subtypes cannot be reliably assessed.

A total of 97.7% of non-clade B viruses were found in African women and, in all cases, clade identity was consistent with variants circulating in the patient's area of origin (1). No significant difference was found between the proportions of African women in patients with unsuccessful amplification (8 [33.3%] of 24) versus those in whom amplification was successful (43 [41.7%] of 103, $p = 0.496$, Fisher exact test), which is indicative of no selection bias. Recent armed conflicts in the African subcontinent have led to an influx into Canada of newcomers from HIV-endemic areas (30,31). Among our study group, dates of arrival into Canada of patients infected with nonclade B HIV-1 correspond with the migration of refugees after the Rwandan genocide and the civil war in the former Republic of Zaire and neighboring Congo (data not shown) (30,31). Nonclade B viruses have spread in Europe and Cuba as a consequence of international travel and immigration from Africa (9–14). Our study demonstrates that multiple HIV-1 clades are being introduced under similar circumstances in a large, North American urban center. From a public health standpoint, antenatal cohorts could represent an important sentinel site to monitor the influx of novel HIV-1 variants in industrialized countries.

Acknowledgments

We thank Kathy Deroy, Silvie Valois, and Martine Caty for expert technical assistance, Ampha Khammy for statistical analysis, and Laurent Knafo for automated DNA sequencing.

This work was supported in part by the Elizabeth Glaser Pediatric AIDS Foundation (grant no. 28-PG-51355), and by the Réseau SIDA-Maladies Infectieuses of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). HS is a Junior Scientist of the FRSQ. BSA is the recipient of a graduate scholarship from the Government of Gabon.

Table. Viral and immune parameters in study participants*

	Overall				Treatment naive		
	Median (IQR) viral load (log copies/mL)†	% viral load <2.7 (n)‡	% viral load <1.7 (n)‡	Median (IQR) CD4+ count (cells/ μ L)†	% receiving ARV therapy (n)‡	Median (IQR) viral load (log copies/mL)†	Median (IQR) CD4+ cell count in treatment-naïve patients (cells/ μ L)†
HIV-1 B clade	3.61 (1.71)	28.8 (17)	11.9 (7)	360 (285)	44.1 (26)	3.95 (1.38)	418 (278)
HIV-1 non-B clade	3.52 (1.39)	22.7 (10)	2.27 (1)	351 (220)	20.5 (9)	3.53 (0.94)	327 (208)
p value	0.927	0.508	0.316	0.476	0.0102§	0.143	0.107

*HIV-1 viral load and CD4+ cell counts were measured as described in Patients and Methods. Significance of differences between groups was tested by Kruskal-Wallis test or Fisher exact test. Analysis was carried out on the whole study group (N = 103) or restricted to those who did not receive treatment (n = 61). IQR, interquartile range; ARV, antiretroviral.

†Kruskal-Wallis test.

‡Fisher exact test.

§Statistically significant ($p < 0.05$) by directional test.

RESEARCH

Ms. Akouamba is currently pursuing PhD studies in the Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal. Her research interests focus on the study of maternal HIV-specific immune responses during pregnancy.

References

- Thomson MM, Perez-Avarez L, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:461-71.
- Simon F, Mauciere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med.* 1998;4:1032-7.
- Pecters M, Sharp PM. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS.* 2000;14(Suppl 3):S129-40.
- Spira S, Wainberg MA, Loemba H, Turner D, Brenner BG. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:229-40.
- Clarke JR. Molecular diagnostic of HIV. *Expert Rev Mol Diagn.* 2002;2:233-9.
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science.* 2002;296:2354-60.
- McCutchan FE. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS.* 2000;14 (Suppl 3):S31-44.
- Kuiken CL, Foley B, Freed E, Hahn B, Korber B, Marx PA, et al., editors. HIV sequence compendium 2002. Los Alamos (NM): Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory; 2002.
- Vallet S, Legrand-Quillien MC, Roger C, Bellein V, Perfezou P, de Saint-Martin L, et al. HIV-1 genetic diversity in Western Brittany, France. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;34:65-71.
- Fransen K, Buve A, Nkengasong JN, Laga M, van der Groen G. Longstanding presence in Belgians of multiple non-B HIV-1 subtypes. *Lancet.* 1996;347:1403.
- Thomson MM, Delgado E, Manjon N, Ocampo A, Villahermosa ML, Marino A, et al. HIV-1 genetic diversity in Galicia, Spain: BG inter-subtype recombinant viruses are circulating among injecting drug users. *AIDS.* 2001;15:509-16.
- Boni J, Pyra H, Gebhardt M, Perrin L, Burgisser P, Matter L, et al. High frequency of non-B subtypes in newly diagnosed HIV-1 infections in Switzerland. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;22:174-9.
- Perrin L, Kaiser L, Yerly S. Travel and spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:22-7.
- Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML, Diaz H, Delgado E, Vasquez-de Parga E, et al. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *AIDS.* 2002;16:1643-53.
- Weidle PJ, Ganea CE, Irwin KL, Pieniazek D, McGowan JP, Oliva N, et al. Presence of human immunodeficiency (HIV) type 1, group M, non-B subtypes, Bronx, New York: a sentinel site for monitoring HIV diversity in the United States. *J Infect Dis.* 2000;181:470-5.
- Delwart EL, Orton S, Parekh B, Dobbs T, Clark K, Busch MP. Two percent of HIV-positive U.S. blood donors are infected with non-subtype B strains. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003;19:1065-70.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:4876-82.
- 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.
- Leitner T, Escanilla D, Franzen C, Uhlen M, Albert J. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:10864-9.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 2001;17:1244-5.
- Sicpel AC, Korber BT. Scanning the database for recombinant HIV-1 genomes. In: Myers G, Korber B, Hahn BH, Jeang KT, Mellors JW, McCutchan FE, et al., editors. *Human retroviruses and AIDS 1995: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences.* Los Alamos (NM): Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory; 1995. p. III-35-III-60.
- Sullivan PS, Do AN, Ellenberger D, Pau CP, Paul S, Robbins K, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) subtype surveillance of African-born persons at risk for group O and group N HIV infections in the United States. *J Infect Dis.* 2000;181:463-9.
- Eshleman SH, Hackett J, Swanson P, Cunningham SP, Drews B, Brennan C, et al. Performance of the Celeris Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2711-7.
- Montavon C, Toure-Kane C, Licgois F, Mpoudi E, Bourgeois A, Vergne L, et al. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in west and west central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000;23:363-74.
- Bikandou B, Takehisa J, Mboudjeka I, Ido E, Kuwata T, Miyazaki Y, et al. Genetic subtypes of HIV type 1 in Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000;16:613-9.
- Adrien A, Leane V, Remis RS, Boivin JF, Rud E, Duperval R, et al. Migration and HIV: an epidemiological study of Montrealers of Haitian origin. *Int J STD AIDS.* 1999;10:237-42.
- Jayaraman GC, Gleeson T, Rekart ML, Cook D, Preiksaitis J, Sidaway F, et al. 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.
- Brodine SK, Shaffer RA, Starkey MJ, Tasker SA, Gilcrest JL, Louder MK, et al. Drug resistance patterns, genetic subtypes, clinical features, and risk factors in military personnel with HIV-1 seroconversion. *Ann Intern Med.* 1999;131:502-6.
- Brodine SK, Starkey MJ, Shaffer RA, Ito SI, Tasker SA, Barile, AJ, et al. Diverse HIV-1 subtypes and clinical, laboratory and behavioral factors in a recently infected US military cohort. *AIDS.* 2003;17:2521-7.
- United Nations High Commissioner for Refugees. *The Rwandan genocide and its aftermath. In: The state of the world's refugees 2000 fifty years of humanitarian action.* London: Oxford University Press; 2000. p. 245-88.
- Direction de la population et de la recherche. *Tableaux sur l'immigration au Québec.* Montreal: Ministère de l'immigration et des communautés culturelles; 2003. p. 15-32.


Address for correspondence: Hugo Soudeyns, Unité d'Immunopathologie Virale, Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Room 6735, Montreal, Quebec H3T 1C5, Canada; fax: 514-345-4794; email: [REDACTED]

Article 2

**LONGITUDINAL STUDY OF HIV-SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE
ACTIVITY DURING PREGNANCY: IMPACT OF ANTIRETROVIRAL
TREATMENT**

Bertine S. Akouamba^{a,c}, Johanne Samson^b, Normand Lapointe^{b,d}, Marc Boucher^{b,e}, and Hugo Soudeyns^{a,c,d}

^aUnité d'immunopathologie Virale and ^bCentre maternel et infantile sur le SIDA, CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; ^cDepartment of microbiology and immunology, ^dPediatrics, and ^eObstetrics & Gynecology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Address correspondence to: Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, room 6735, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada. Tel.: +1 514 345 4931 (ext. 3907). Fax: +1 514 345 4794. E-mail 

Word count: Text: 3,493 words; Abstract: 249 words.

Source of support: This work was supported by grants from the CIHR-Health Canada Research Initiative on HIV-AIDS (grant noHOP-75352) and by an infrastructure grant from le Réseau SIDA-maladies infectieuses of le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

Running head: HIV-specific CTL activity during pregnancy.

ABSTRACT

Objective: Development of immunization and immunotherapy as additional means to prevent mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1 would require a better understanding of maternal HIV-specific immunity and its possible interaction with antiretroviral therapy (ART).

Design: A longitudinal assessment of HIV-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses was performed in a group of 11 pregnant women infected with HIV-1, including 7 who were followed during consecutive pregnancies.

Methods: Antigenic specificity and precursor frequencies of HIV-specific CTL were characterized throughout pregnancy using autologous targets expressing selected HIV-1 gene products, ^{51}Cr release assay, and limiting dilution analysis.

Results: CTLp frequency was negatively correlated with CD4^+ and CD8^+ T cell counts ($p = 0.0154$ and $p = 0.0475$, respectively). HIV-specific CTLp frequency was reduced in the presence of treatment ($p = 0.0435$, Mann-Whitney U test). HIV-1 viral load was higher in pregnancies where Gag was the HIV-1 antigen most frequently recognized by CTL ($p = 0.0508$, Mann-Whitney U test). Finally, differences in the hierarchy of HIV-1 antigenic recognition by CTL were positively correlated with the duration of the inter pregnancy interval (IPI) ($r^2 = 0.601$; $p = 0.0240$).

Conclusions: Pregnant HIV-infected women generate robust HIV-specific CTL responses that are inconsistent with a dysfunction of cell-mediated immunity during pregnancy. ART is associated with a decline in the magnitude of HIV-specific CTL responses during pregnancy. Finally, evolution of CTL responses during the IPI is

characterized by changes in the hierarchy of antigenic recognition by CTL, but not by variations in the breadth and/or magnitude of these responses.

KEY WORDS

Cellular immunity; pathogenesis; prevention of perinatal transmission; vertical transmission; women.

INTRODUCTION

Pregnancy is associated with quantitative and qualitative modulation of maternal immunity [1-4]. As a general rule, immunoglobulin synthesis is increased in pregnancy [5,6] whereas cell-mediated immune responses are inhibited [7], as shown by decreased resistance to intracellular pathogens such as Plasmodium [8]. Further evidence supporting pregnancy-associated immunomodulation is the remission of rheumatoid arthritis and multiple sclerosis, two T cell-mediated autoimmune disorders, in the majority of pregnant sufferers [9,10].

Factors associated with an increased risk of mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1 include low CD4⁺ T lymphocyte counts [11], high viral load [12,13], chorioamnionitis [14], mother-child class I HLA concordance [15,16], cervico-vaginal infections, mode of delivery, duration of membrane rupture, and premature delivery [17,18]. Increased risk of MTCT was also associated with levels of HIV-1-infected cells in breast milk [19] and with duration of breastfeeding [20]. Current approaches to prevent MTCT rely on elective caesarean section before labor and membrane rupture [21], avoidance of breastfeeding [22], and, most importantly, the use of antiretroviral therapy (ART) during pregnancy, labor and the early neonatal period [12,23]. However, the short half-life of antiretroviral drugs, their toxicity, and the emergence of drug-resistant HIV-1 variants may limit the long-term efficacy of ART in preventing MTCT [24]. Transmission to the infant in the presence of ART was also reported [25]. Most importantly, there is only limited access to ART in resource-poor settings [26,27].

CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) play a pivotal role in controlling disease progression in both simian immunodeficiency virus (SIV) [28] and HIV-1 infections [29]. Indeed, expansion of antigen-specific T lymphocytes is temporally associated with reduction in plasma viremia [30,31], and CD8⁺ T cell depletion results in high-level viral replication [28,32]. Emergence of CTL escape variants and the temporal relationship between CTL escape, decreased HIV-specific CTL activity, and loss of control of HIV-1 replication are consistent with significant levels of selective pressure exerted on viral populations by CTL responses [33-35]. In the context of MTCT, stronger HIV-specific CD8⁺ T cell responses were evidenced in non-transmitting mothers [36,37] and HIV-specific CTL were frequently detected in uninfected children born to HIV-infected mothers [38,39]. Selective MTCT of CTL escape mutants was also reported [40,41].

HIV-specific CTL frequency declines in HIV-infected adults and children following initiation of ART [42-44]. However, there is only limited knowledge regarding the antigenic specificity and magnitude of HIV-specific CTL responses in pregnancy, the effects initiation of ART has on these responses and the evolution of HIV-specific cell-mediated immunity during the inter-pregnancy interval (IPI). To investigate these issues, a longitudinal characterization of HIV-specific CTL effector responses was performed in 11 HIV-infected women, 7 of whom were followed through consecutive pregnancies.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

Eleven pregnant HIV-infected women were selected among participant to the Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) mother-child cohort (CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada). Six of those patients were followed during 2 consecutive pregnancies and 1 during 3 consecutive pregnancies. HIV-1 serologic status was determined using the AxSYM HIV 1/2 gO method (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany) and confirmed by western blot. HIV-1 viral load was measured using the Versant HIV-1 RNA 2.0 or 3.0 assays (bDNA, Bayer, Pittsburgh, PA, USA) (detection thresholds of 2.70 and 1.70 log₁₀ RNA copies/ml, respectively). T cell counts were measured by flow cytometry. HIV genotyping was performed by sequencing a 1,497 nucleotide fragment amplified from the HIV-1 pol gene (positions 2253-3749) (Virco BVBA, Mechelen, Belgium) or a 524 nucleotide pol fragment (positions 2597-3120) and a 705 nucleotide env fragment (positions 6430-7135) [45]. First, second, and third trimesters of pregnancy were defined as 1-12, 13-28, and 29-41 weeks of gestation, respectively. Gestational age, estimated date of fertilization, and expected date of confinement were calculated based on the self-reported date of the first day of the last normal menstrual period (LMP) when available (n = 11), or from fetal biometry obtained through ultrasound examination performed before 20 weeks of gestation (n = 8). IPI was computed as the time from delivery to the first day of the LMP of the subsequent pregnancy [46]. This research protocol was conducted according to the guidelines of the Ethics Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada, where the study was conducted. Standardized clinical follow-up, including ART, was provided to all women and their children.

Cell isolation and preparation

Venous blood was collected in tubes containing EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on Ficoll-Hypaque density gradients (Amersham Biosciences, Mississauga, Canada). Aliquots of 5×10^6 PBMC were cryopreserved in 90% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Burlington, Canada) supplemented with 10% (v/v) dimethyl sulfoxide and were thawed before use.

T lymphocyte culture

For T cell cloning, a microculture technique was used that allows the majority of human T lymphocytes to undergo clonal expansion [47]. Briefly, serial dilutions of PBMC (5-400 cells per well) were seeded in round-bottom 96-well plates (Corning, New York, NY, USA) containing 50,000 irradiated (3,000 cGy) allogeneic feeder cells and were cultured for 21 days in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS (Invitrogen), 2 $\mu\text{g/ml}$ phytohemagglutinin (PHA) (Sigma, St-Louis, MO, USA), and 20% (v/v) recombinant IL-2 (rIL-2) (Hoffman-La Roche, Nutley, NJ, USA; obtained through the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagents Program). Fresh medium and rIL-2 were replenished bi-weekly.

Cytotoxicity testing

Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B lymphoblastoid cell lines (BLCL) were generated from each patient to serve as autologous targets in CTL assays. Briefly, 5×10^6 PBMC were infected with 500 μl supernatant from the B95-8 cell line and were cultured

in the presence of cyclosporin A (2 $\mu\text{g/ml}$) as previously described [48]. BLCL were infected at a multiplicity of infection of 10 plaque forming units/cell with recombinant vaccinia viruses expressing HIV-1 clade B proteins, including: VVTG 1144 (Gag), VVTG 3167 (Pol), VVTG 1132 (gp120), VVTG 9-1 (Env), VVTG 4113 (Rev), VVTG 3196 (Tat), VVTG 1147 (Nef), and VVTG 186P (*Escherichia coli* β -galactosidase control) (Transgene, Strasbourg, France). Targets were then loaded with ^{51}Cr -Sodium chromate (Amersham Biosciences) and CTL activity was measured in a standard 5h ^{51}Cr release assay. Specific lysis was computed as $100 \times (E-S)/(T-S)$, where E is the experimental ^{51}Cr release, S is the spontaneous release, and T is the maximum release when targets are lysed with 10% (v/v) Triton X-100. Results were considered positive when % specific lysis was $\geq 10\%$ above control. Minimal estimates of the frequency of CTL precursors (CTLp) were derived by limiting dilution analysis (LDA) and were computed from the Poisson distribution relationship between the responding cell number and the logarithm of percentage of non-responding (negative) microcultures using the minimal Chi square method [49], as implemented in ELIDA 12c (Ellitron Computing, Ladera Ranch, CA, USA).

Statistical analysis

Normality of the distribution of sample data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Student's *t* tests (normally-distributed data), Mann-Whitney *U* tests (non-Gaussian distribution), and Kruskal-Wallis tests with Dunn's post tests (multiple comparisons) were used to assess differences between groups. Spearman's correlation was used to test the strength of association between variables and to process rank data. Categorical

variables were examined using Fisher's exact test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Clinical characteristics of study subjects

The study group comprised 11 pregnant, HIV-infected women. Six subjects were followed during 2 consecutive pregnancies and 1 during 3 consecutive pregnancies, for a total of 19 individual pregnancies examined. Biological samples were obtained and clinical parameters were measured at 3 separate time points in 17 of 19 pregnancies and at 2 time points in the 2 remaining cases (TV437a and TV501a), for a total of 55 time points analyzed. At study entry, median age was 30.6 years (range = 24.7-43.4 years), median CD4⁺ T cell counts were 510 cells/mm³ (interquartile range (IQR) = 192-594 cells/mm³), and median CD8⁺ T cell counts were 627 cells/mm³ (IQR = 387-882 cells/mm³). Median HIV-1 viral load at study entry was 3.34 log₁₀ RNA copies/ml plasma (IQR = 2.70-4.19 log₁₀ RNA copies/ml plasma). Six of 11 subjects (54.5%) were infected with clade B HIV-1, while 5 were infected with non-clade B variants, including subtypes A (n = 2), C (n = 2), and one unclassified recombinant (TV555; Table 1) [45]. ART was used for maternal health and to prevent MTCT in 17 of 19 pregnancies studied (89.5%). In 4 of 17 treated subjects (23.5%), ART consisted of double combination therapy with nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), while triple combination protease inhibitor (PI)-based regimens were used in 13 of 17 cases (76.5%) (Table 1). Overall, there was a strong positive correlation between CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts measured at

corresponding time points ($r^2 = 0.494$; $p < 0.0001$) (Figure 1A), but no such correlation was evidenced between circulating HIV-1 viral load and either CD4⁺ or CD8⁺ T cell counts ($r^2 = 0.0121$, $p = 0.453$; and $r^2 = 0.0215$, $p = 0.315$, respectively) (Figures 1B and 1C). Predictably, median viral load measured at time points where patients were not under antiretroviral treatment (3.42 log₁₀ RNA copies/ml plasma) was significantly higher than that measured at times when patients were treated with ART (1.97 log₁₀ RNA copies/ml plasma; $p = 0.0005$, Mann-Whitney *U* test) (Figure 1D).

HIV-specific CTL responses

To characterize CTL responses, CD8⁺ T cell microcultures were derived from PBMC samples obtained at each time point by *in vitro* expansion on irradiated allogeneic feeder cells supplemented with PHA and IL-2. Cytotoxic activity of expanded microcultures was then tested against target cells expressing either one of 7 clade B HIV-1 proteins (Gag, Pol, gp120, Env, Rev, Tat, and Nef) using a standard ⁵¹Cr release assay. CTLp frequencies were computed by LDA. This method was preferred over ELISpot and intracellular cytokine staining because of limitations on the size of blood samples that can be obtained from patients during pregnancy. HIV-specific CTLp (any target) were detected in all study subjects, with the exception of TV437 and TV479, in whom no proliferation of T cell microcultures was observed in both first and second pregnancy, even at high input cell number (400 cells per well; data not shown). HIV-specific CTLp frequencies observed in study subjects ranged between 0 (TV853, 2^a pregnancy) and 1.569×10^{-2} (1:64, TV733). Overall, CTLp frequency was negatively correlated with CD4⁺ T cell counts ($r^2 = 0.134$; $p = 0.0154$) and CD8⁺ T cell counts ($r^2 = 0.0822$; $p =$

0.0475) (Figure 2A and 2B). CTLp frequency was also positively correlated with HIV-1 viral load in study participants, but this trend did not reach statistical significance ($r^2 = 0.0590$; $p = 0.0654$) (Figure 2C). CTLp frequencies were compared in samples from the first ($n = 7$), second ($n = 12$), and third trimesters ($n = 16$) and were found to be stable throughout pregnancy ($p = 0.718$, Kruskal-Wallis test) (data not shown). Likewise, median CTLp frequencies were not significantly different between the first and subsequent pregnancies ($p = 0.980$, Mann-Whitney U test), and were similar in subjects infected with clade B ($n = 6$) and non-clade B ($n = 5$) HIV-1 variants ($p = 0.251$, Mann-Whitney U test) (data not shown). Finally, to characterize the impact of ART on HIV-specific CTL responses, subjects and time points were stratified as treated ($n = 26$) or untreated ($n = 15$) (Table 1). Median HIV-specific CTLp frequency was higher in absence of treatment (1.747×10^{-3} , IQR = 1.469×10^{-3} - 6.263×10^{-3}) than in the presence of ART (1.332×10^{-3} , IQR = 7.869×10^{-4} - 2.582×10^{-3}), a statistically-significant difference ($p = 0.0435$, Mann-Whitney U test) (Figure 2D).

Specificity and hierarchy of antigenic recognition

To provide a global assessment of antigenic specificity and hierarchy of HIV-1 antigen recognition by CTL, microculture cytotoxicity data obtained in first, second, and third trimester samples were pooled for each individual pregnancy. CTL responses directed against all 7 antigens tested detected in the majority (13 of 15; 86.6%) of pregnancies where T cell microculture proliferation was observed (*i.e.* all except TV437 and TV479). Gag was the antigen most frequently recognized by CTL, accounting for a median 21.01% of HIV-specific microcultures derived from study subjects on a per patient basis

(IQR = 17.43%-27.65%). In terms of CTL recognition, Gag was closely followed by Pol (median = 16.42%, IQR = 10.08%-24.65%), gp120 (median = 13.85%, IQR = 10.56%-16.20%), Env (median = 12.31%, IQR = 9.75%-17.23%), Tat (median = 11.96%, IQR = 8.37%-14.55%), Nef (median = 11.76%, IQR = 7.04%-16.36%), and Rev (median = 7.46%, IQR = 5.54%-10.88%). Statistical analysis of this hierarchy revealed that there were significant differences in the median frequencies of recognition of the 7 CTL targets within our study group ($p = 0.0136$, Kruskal-Wallis test), and that these disparities were largely accounted for by the difference in levels of recognition of Gag and Rev ($p < 0.01$, Dunn's Multiple Comparison test) (Figure 3A). Similar results were obtained when data were analyzed on a per pregnancy basis instead of on a per patient basis (Figure 3B). Interestingly, median HIV-1 viral load was higher in pregnancies where Gag was the HIV-1 antigen most frequently recognized by T cell microcultures (3.21 log₁₀ RNA copies per ml plasma, IQR = 2.74-3.67 log₁₀ RNA copies/ml plasma), as compared with pregnancies in which another gene product topped the hierarchy (1.97 log₁₀ RNA copies per ml plasma, IQR = 1.70-3.68 log₁₀ RNA copies/ml plasma; $p = 0.0508$, Mann-Whitney *U* test). In addition, the proportion of time points with HIV-1 viral load below 2.70 log₁₀ RNA copies/ml plasma was significantly lower in pregnancies where Gag was the most frequently recognized antigen (4 pregnancies, 3 of 12 time points), as compared with pregnancies in which another HIV-1 antigen was preferentially targeted (11 pregnancies, 22 of 32 time points; $p = 0.0115$, Fisher's exact test).

Hierarchy of CTL target recognition was also examined using rank statistics. In subjects with multiple pregnancies, the hierarchy of HIV-1 antigen recognition was not significantly correlated between consecutive pregnancies ($r^2 = 8.262 \times 10^{-5}$ -0.0882;

$p > 0.498$) (Figure 3C). Variation in hierarchy was tested by computing the sum of squared differences between ranks for each CTL target (Σd_2) and using this score to compare individual pregnancies in a pairwise manner. This analysis revealed that differences in hierarchy of antigen recognition were comparatively larger between consecutive pregnancies (median $\Sigma d_2 = 57.00$) than when subjects with one pregnancy were compared with one another in a pairwise fashion (median $\Sigma d_2 = 38.50$; $p = 0.0219$, Student's t test) (Figure 4A). This suggests the existence of robust selective forces shaping the profile of HIV-1 antigen recognition by CTL between consecutive pregnancies. In addition, the magnitude of differences in hierarchy was positively correlated with duration of the IPI in subjects with multiple pregnancies ($r^2 = 0.601$; $p = 0.0240$), indicating that longer intervals were associated with comparatively larger differences in antigenic recognition profiles.

DISCUSSION

This study was initiated in order to shed light on a number of issues regarding HIV-specific cell-mediated immunity in pregnancy, namely: a) the antigenic specificity, magnitude, and hierarchy of HIV-specific CTL responses; b) the effects the introduction of ART has on these responses; and c) the evolution of HIV-specific cell-mediated immunity during the IPI. To investigate these issues, a longitudinal characterization of HIV-specific CTL responses was performed in 11 HIV-infected women, 7 of whom were followed throughout consecutive pregnancies and most of whom were treated with ART.

Our results showed that, all CTL targets confounded, HIV-specific CTLp frequency was negatively correlated with CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts in study subjects. As CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts are strongly correlated with one another in our study group, this indicates that HIV-specific CTL responses become progressively more prevalent as HIV disease progresses. As well, HIV-specific CTLp frequency was not significantly correlated with HIV-1 viral load in this study group, though a positive trend was observed. These results are consistent with previous reports that show little or no association between T cell-mediated immune responses, CD4⁺ T cell counts and viral load in presence of treatment [50,51]. In addition, HIV-specific CTLp frequency was significantly higher at time points where no treatment was administered (*i.e.* in absence of treatment or prior to initiation of treatment). This finding is in line with previous reports that showed a decline in CTL responses following initiation of ART in HIV-infected children [44] and adults [42,43,52,53] and reflects the need for antigen exposure to maintain elevated levels of CTL in circulation. The fact that treatment is associated with lower CTLp frequencies also reinforces the notion that the negative correlation between CTLp and CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts was not confounded by subjects with low CD4 being treated with more potent ART regimens. In the present study, CTL activity was measured using ⁵¹Cr release assay following *in vitro* T cell expansion, and CTLp frequencies were computed by LDA. This method was preferred over ELISpot and intracellular cytokine staining, which require substantially larger numbers of input cells to provide equivalent antigenic coverage, numbers that could not ethically be obtained from pregnant women. By definition, CTLp have an intrinsic capacity to proliferate *in vitro*. As such, these cells should correspond more closely to central memory (TCM;

CD45RO⁺CCR7⁺) or effector memory (T_{EM}; CD45RO⁺CCR7⁻) CD8⁺ T cells, which possess significantly greater proliferative capacity than fully-differentiated CTL effectors [54].

Overall, median CTLp frequency was not significantly different in subjects infected with clade B versus non-clade B HIV-1 variants. As the targets used in ⁵¹Cr release assays only expressed clade B gene products, this suggests that a significant proportion of CTL responses observed in non-B patients result from cross-clade recognition of HIV-1 antigens, a phenomenon that has been extensively documented [55-57]. Finally, no significant cross-sectional variations in median HIV-specific CTLp frequencies were observed between first, second, and third trimesters, or between consecutive pregnancies in our study group. As CTLp frequencies represent global responses to all HIV antigens tested, these results should not be interpreted as evidence of a lack of qualitative differences in CTL (see below). CTL responses were then examined based on the identity of HIV antigens recognized in individual study subjects. This analysis revealed all 7 HIV antigens tested were recognized in every pregnancy, with the exception of TV481b (5 antigens) and TV853a (6 antigens) (Figure 3C). Consequently, our data does not support the existence of significant cross-sectional (inter-host) and longitudinal (intra-host) differences in terms of breadth of HIV-1 antigen recognition by CTL. Gag was the antigen most frequently recognized (*i.e.* immunodominant) by T cell microcultures derived from study subjects, followed by Pol and Env, while Tat, Rev, and Nef were recognized least frequently. These results are in agreement with a recent study which reported that Nef-specific CTLs dominated the total response in subjects with primary HIV-1 infection, while Gag-, Env- and Pol-specific CTLs topped the hierarchy

following transition to chronic HIV-1 infection [58]. However, our results are unlike those of Jin *et al.*, who reported higher frequencies of Nef-specific CTLp in non-transmitting mothers [36]. Similarly, an association between Gag-dominant CTL responses and higher viral load was evidenced in our study group, in contrast to the preferential targeting of Gag by CTL that was associated with control of viral replication in primary and chronic HIV-1 infection [59,60]. These differences might stem from pregnancy-related factors or from differences in sample size and study populations.

Finally, using rank statistics, we showed that changes in the hierarchy of HIV-1 antigen recognition were greater and more narrowly distributed between consecutive pregnancies (intra-host) than what was observed in pairwise comparisons of hierarchies from different study subjects (inter-host). Even though only a limited number of subjects were examined, this finding suggests the presence of intra-host selective forces that drive evolution of hierarchical antigenic recognition between pregnancies and results in macroscopic changes in immunodominance. Furthermore, the extent of variation in the hierarchy of antigenic recognition observed between consecutive pregnancies was correlated with the duration of the IPI, which suggests that intra-host hierarchical diversification comprises a time-dependent component. To our knowledge, this is the first time that such time-dependent evolution of the hierarchy of antigen recognition by CTL is described in the context of a chronic viral infection. Possible explanations for this phenomenon could include sequential waves of expansion and contraction of CTL clones of varied antigenic specificity [61] and/or cyclic escape from CTL responses [62], something which we could not document in the present study. Finally, as all participants

were pregnant, we cannot exclude that some aspects of hierarchical diversification were related to pregnancy-associated immune modulation.

In summary, data presented herein indicate that: a) pregnant HIV-infected women generate robust HIV-specific CTL responses that are inconsistent with a dysfunction of cell-mediated immunity during pregnancy; b) ART is associated with a decline in the magnitude of HIV-specific CTL responses during pregnancy; c) cross-clade CTL responses can be detected in pregnant women infected with HIV-1; and d) evolution of CTL responses during the IPI is characterized by changes in the hierarchy of antigenic recognition by CTL, not by variations in breadth and/or magnitude of that response. These results add to the body of evidence [63] supporting the development of immunization strategies to prevent MTCT of HIV-1.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank all study participants, as well as Martine Caty, Silvie Valois, and Ampha Khammy for expert technical assistance, and Doris G. Ransy and Elyse Jollette for critical reading of the manuscript. Supported by grants from the CIHR-Health Canada Research Initiative on HIV-AIDS (grant no HOP-75352) and by an infrastructure grant from le Réseau SIDA-maladies infectieuses of le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). B.S.A. was the recipient of a Graduate Scholarship from le Ministère de l'éducation du Gabon. H.S. is a Junior-II Scientist of FRSQ.

REFERENCES

1. Lichtenstein MR. Tuberculin reaction in tuberculosis during pregnancy. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* 1942; 48:89-93.
2. Shiu HM, Schottenfeld D, McLean B, Fortener JG. Adverse effect of pregnancy on melanoma. *Cancer* 1976; 37:181-187.
3. Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J. Cytokine production in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38:418-422.
4. Raghupathy R, Maksheed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000; 15:713-718.
5. Wegmann TG, Hui L, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology Today* 1993; 14:353-356.
6. Narita M, Yamada S, Kikuta H, Togashi T. Reconstitution of humoral immunity during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44:148-152.
7. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, Amino N. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:368-377.
8. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:105-117.

9. Da Silva JAP, Spector TD. The role of pregnancy in the course and etiology of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1992; 11:189-194.
10. Soldan SS, Alvarez Retuerto AI, Sicotte NL, Voskuhi RR. Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estradiol. *J Immunol* 2003; 171:6267-6274.
11. St Louis ME, Kamenga M, Brown C, Nelson AM, Manzila T, Batter V, et al. Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic, and placental factors. *JAMA* 1993; 269:2853-2859.
12. Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, Todd JA, Herman SA, McSherry GD, et al. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1996; 335:1621-1629.
13. Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TAC, Burchett SK, et al. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341:394-402.
14. Bhoopat L, Khunamorpong S, Sirivatanapa P, Rithaporn T, Lerdsrimongkol P, Thorner PS, Bhoopat T. Chorioamniotitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype in the early gestational period. *Mod Pathol* 2005; 18:1357-1364.

15. MacDonald KS, Embree J, Njenga S, Nagelkerke NJD, Ngatia I, Mohammed Z, et al. Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* 1998; 177:551-556.
16. Polycarpou A, Ntsais C, Korber BT, Elrich HA, Winchester R, Krogstad P, et al. Association between maternal and infant class I and II HLA alleles and of their concordance with the risk of perinatal HIV type 1 transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18:741-746.
17. European Collaborative Study. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 1992; 339:1007-1012.
18. The International Perinatal HIV Group. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1999; 340:977-987.
19. Rousseau CM, Nduati RW, Richardson BA, John-Stewart GC, Mbori-Ngacha DA, Kreiss JK, Overbaugh J. Association of levels of HIV-1-infected breast milk cells and risk of mother-to-child transmission. *J Infect Dis* 2004; 190:1880-1888.
20. Taha TE, Hoover DR, Kumwenda NI, Fiscus SA, Kafulafula G, Nkhoma C, et al. Late Postnatal Transmission of HIV-1 and Associated Factors. *J Infect Dis* 2007; 196:10-14.
21. Thorne C, Newell ML. Prevention of mother-to-child transmission of HIV infection. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17:247-252.

22. Rollins N, Meda N, Becquet R, Coutoudis A, Humphrey J, Jeffrey B, et al. Preventing postnatal transmission of HIV-1 through breast-feeding: modifying infant feeding practices. *J Acquir Defic Syndr* 2004; 35:188-194.
23. Mofenson LM; Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Public Health Service Task Force. U.S. Public Health Service Task Force recommendations for the use of antiretroviral drugs in pregnant women infected with HIV-1 for maternal health and for reducing perinatal HIV-1 transmission in the United States. *MMWR Recomm Rep* 2002; 51(RR-18):1-38.
24. Welles SL, Pitt J, Colgrove R, McIntosh K, Chung PH, Colson A, et al. HIV-1 genotypic zidovudine drug resistance and the risk of maternal-infants transmission study. The Women and Infants Transmission Study Group. *AIDS* 2000; 14:263-281.
25. Ioannidis JP, Abrams EJ, Ammann A, Bulterys M, Goedert LG, Korber BT, et al. Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads < 1000 copies/mL. *J Infect Dis* 2001; 183:539-545.
26. Teixeira PR, Vitoria MA, Barcarolo J. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. *AIDS* 2004; 18 Suppl 3:S5-7.
27. Badri M, Cleary S, Maartens G, Pitt J, Bekker LG, Orrell C, Wood R. When to initiate highly active antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa? A South African cost-effectiveness study. *Antivir Ther* 2006; 11:63-72.

28. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ T lymphocytes. *Science* 1999; 283:857-860.
29. Brodie SJ, Lewinsohn DA, Patterson BK, Jiyamapa D, Corey L, Greenberg PD, Riddell SR. In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific T cells. *Nat Med* 1999; 5:34-41.
30. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994; 68:6103-6110.
31. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andres CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994; 68:4650-4655.
32. Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC, Martin MA. Administration of anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/ human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol* 1998; 72:164-169.
33. Soudeyns H, Paolucci S, Chappey C, Daucher M, Graziosi C, Vaccarezza M, et al. Selective pressure exerted by immunodominant HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses drives DNA sequence variation in the cognate epitope. *Eur J Immunol* 1999; 29:3629-3635.

34. Oxenius A, Price DA, Trkola A, Edwards C, Gostick E, Zhang HT, et al. Loss of viral control in early HIV-1 infection as temporally associated with sequential escape from CD8⁺ T-cell responses and decrease in HIV-1-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell frequencies. *J Infect Dis* 2004; 190:713-721.
35. Allen TM, Altfeld M, Geer SC, Kalife ET, Moore C, O'sullivan KM, et al. Selective escape from CD8⁺ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J Virol* 2005; 79:13239-13249.
36. Jin X, Roberts CG, Nixon DF, Cao Y, Ho DD, Walker BD, et al. Longitudinal and cross-sectional analysis of cytotoxic T lymphocyte responses and their relationship to vertical human immunodeficiency virus transmission. ARIEL Project Investigators. *J Infect Dis* 1998; 178:1317-1326.
37. Plaeger S, Bermudez S, Mikyas Y, Harawa N, Dickover R, Mark D, et al. Decreased CD8 cell-mediated viral suppression and other immunologic characteristics of women who transmit human immunodeficiency virus to their infants. *J Infect Dis* 1999; 179:1388-1394.
38. Cheynier R, Langlade-Demoyen P, Marescot MR, Blanche S, Blondin G, Wain-Hobson S, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur J Immunol* 1992; 22:2211-2217.

39. Rowland-Jones SL, Nixon DF, Aldhous MC, Gotch F, Ariyoshi K, Hallam N, et al. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but infected infant. *Lancet* 1993; 341:860-861.
40. Wilson CC, Brown RC, Korber BT, Wilkes BM, Ruhl DJ, Sakamoto D, et al. Frequent detection of escape from cytotoxic T-lymphocyte recognition in perinatal human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transmission: The Ariel projects for the prevention of transmission of HIV from mother to infant. *J Virol* 1999; 73:3975-3985.
41. Pillay T, Zhang HT, Drijfhout JW, Robinson N, Brown H, Khan M, et al. Unique acquisition of cytotoxic T-lymphocyte escape mutants in infant human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2005; 79:12100-12105.
42. Kalams SA, Goulder PJ, Shea AK, Jones NG, Trocha AK, Ogg GS, Walker BD. Levels of HIV type 1-specific cytotoxic T lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 1999; 73:6721-6728.
43. Soudeyns H, Campi G, Rizzardi GP, Lenge C, Demarest JF, Corey L, et al. Initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection induces rapid stabilization of the T-cell receptor β chain repertoire and reduces the level of T-cell oligoclonality. *Blood* 2000; 95:1743-1751.
44. Spiegel HM, DeFalcon E, Ogg GS, Larsson M, Beadle TJ, Tao P, et al. Changes in frequency of HIV 1-specific cytotoxic T cell precursor and circulating effectors

- after combination antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* 1999; 180:359-368.
45. Akouamba BS, Viel J, Charest H, Merindol N, Samson J, Lapointe N, et al. HIV-1 genetic diversity in antenatal cohort, Canada. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1230-1234.
46. Nguyen RHN, Wilcox A. Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms. *J Epidemiol Community Health* 2005; 59:1019-1021.
47. Moretta A, Pantaleo G, Moretta L, Cerottini JC, Mingari MC. Direct demonstration of the clonogenic potential of every peripheral blood T cell. *J Exp Med* 1983; 157:743-754.
48. Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, et al. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8⁺ T cell clones during primary infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:9848-9853.
49. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. *J Immunol* 1981; 126:1614-1619.
50. Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, et al. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1-(HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* 2003; 77:2081-2092.

51. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, et al. 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; 75:11983-11991.
52. Seth A, Markee J, Hoering A, Sevin A, Sabath DE, Schmitz JE, et al. Alterations in T cell phenotype and human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic after potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2001; 183:722-729.
53. Gorochov G, Neumann AU, Parizot C, Li T, Kalmata C, Debre P. Down-regulation of CD8⁺ T cell-expansions in patients with HIV infection receiving highly active combination therapy. *Blood* 2001; 97:1787-1795.
54. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Ann Rev Immunol* 2004; 22:745-763.
55. Cao H, Kanki P, Sankalé JL, Dieng-Sarr A, Mazzara GP, Kalams SA, et al. Cytotoxic T-lymphocyte cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades: implication for vaccine development. *J Virol* 1997; 71:8615-8623.
56. Frahm N, Korber BT, Adams CM, Szinger JJ, Draenert R, Addo MM, et al. Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J Virol* 2004; 78:2187-2200.

57. Barugahare B, Baker C, K'Aluoch O, Donovan R, Elrefaei M, Eggena M, et al. Human immunodeficiency virus-specific responses in adult Ugandans: patterns of cross-clade recognition. *J Virol* 2005; 79:4132-4139.
58. Lichterfeld M, Yu XG, Cohen D, Addo MM, Malenfant J, Perkins B, et al. HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity. *AIDS* 2004; 18:1383-1392.
59. Masemola A, Mashishi T, Khoury G, Mohube P, Mokgotho P, Vardas E, et al. Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8⁺ T cells; correlation with viral load. *J Virol* 2004; 78:3233-3243.
60. Patke DS, Langan SJ, Carruth LM, Keating SM, Sabundayo BP, Margolick JB, et al. Association of Gag-specific T lymphocyte responses during the early phase of human immunodeficiency virus type 1 infection and lower virus load set point. *J Infect Dis* 2002; 186:1177-1180.
61. Soudeyns H, Champagne P, Holloway CL, Silvestri GU, Ringuette N, Samson J, et al. Transient T cell receptor BV-specific expansions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the early phase of pediatric human immunodeficiency virus infection: characterization of expanded cell populations by T cell receptor phenotyping. *J Infect Dis* 2000; 181:107-120.

62. Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 2004; 10:282-289.

63. Safrit JT, Ruprecht R, Ferrantelli F, Xu W, Kitabwalla M, Van Rompay K, et al. Immunoprophylaxis to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 35:169-177.

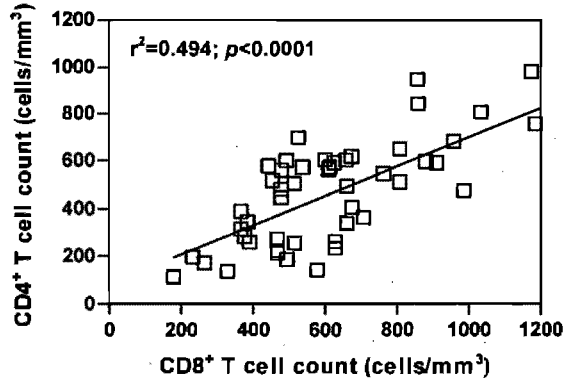
TABLE 1. Clinical characteristics of study participants

Subjects	Age (yrs) ²	CD4 ⁺ T cell count (cells/ μ l) ²	CD8 ⁺ T cell count (cells/ μ l) ²	Viral load (log ₁₀ RNA copies/ml plasma) ²	HIV-1 clade	Country of origin	Antiretroviral treatment ³		
							1 st trimester ⁴	2 nd trimester	3 rd trimester
TV437a ⁴	43.4	559	481	<2.70	B	HTI	none	AZT/3TC	AZT/3TC
TV437b	44.5	570	540	<2.70			AZT/3TC/SQV	AZT/3TC/SQV	AZT/3TC/SQV
TV457	33.4	184	496	3.08	C	COD	AZT/3TC/IDV	AZT/3TC/IDV	AZT/3TC/IDV
TV463	36.5	946	858	<2.70	B	CAN	none	none	none
TV479a	27.8	192	234	4.51	B	CAN	none	AZT/3TC	AZT/3TC
TV479b	29.3	110	180	4.71			none	D4T/3TC	D4T/3TC
TV481a	31.7	980	1176	4.19	B	HTI	none	none	AZT/3TC
TV481b	37.9	572	1210	4.97			AZT/3TC	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV
TV501a	30.6	342	387	3.70	B	CAN	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV
TV501b	33.3	598	494	1.92			AZT/3TC/ABC	AZT/3TC/ABC	AZT/3TC/ABC
TV501c	35.9	312	368	<1.70			AZT/3TC/ABC	AZT/3TC/ABC	AZT/3TC/ABC
TV507	28.2	589	627	3.34	A	COG	none	none	none
TV555a	29.8	168	266	4.33	AJ ⁵	COD	none	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV
TV555b	32.9	253	517	2.07			AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NVP
TV565a	31.0	510	810	2.23	B	CAN	AZT/3TC	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV
TV565b	31.8	600	660	1.95			AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NVP
TV733	24.7	594	882	3.42	A	COD	none	none	AZT/3TC/NFV
TV853a	25.5	475	988	<1.70	C	ZWE	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV
TV853b	27.2	840	860	<1.70			AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV	AZT/3TC/NFV

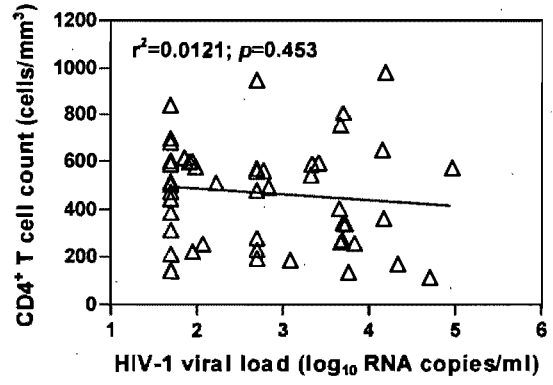
CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts and HIV-1 clade were determined as described under Materials and Methods. ²Measured at the time point closest to the estimated date of fertilization, as described under Materials and Methods. ³First, 2nd, and 3rd trimesters were defined as 1-12, 13-28, and 29-41 weeks of gestation, respectively. ⁴Lowercase letter in patient identifier denotes first (a), second (b), or third (c) consecutive pregnancy, respectively. ⁵Unclassified recombinant containing regions of significant homology to clades A and J (see reference n°61). HTI: Haiti, COD: Democratic Republic of the Congo, COG: Congo, CAN: Canada, ZWE: Zimbabwe, AZT: zidovudine, 3TC: lamivudine, SQV: saquinavir, D4T: stavudine, NFV: nefinavir, NVP: nevirapine, ABC: abacavir, nd: not determined.

Figure 1. Clinical parameters in study participants. Absolute CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts and HIV-1 viral load were determined as described under Materials and Methods. A. Correlation between CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts. B. Correlation between CD4⁺ T cell counts and HIV-1 viral load. C. Correlation between CD8⁺ T cell counts and HIV-1 viral load. D. HIV-1 viral load in subjects/time points stratified according to the presence or absence of antiretroviral treatment.

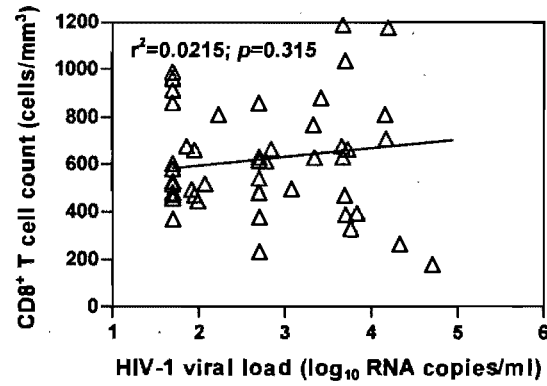
A



B



C



D

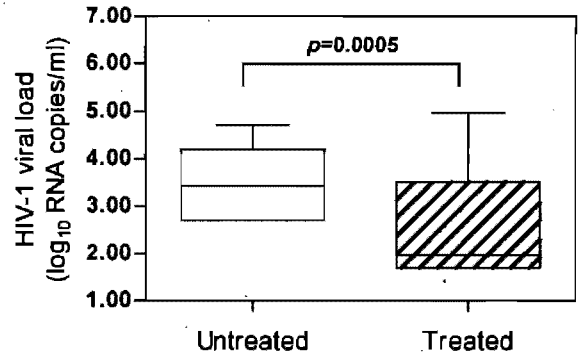
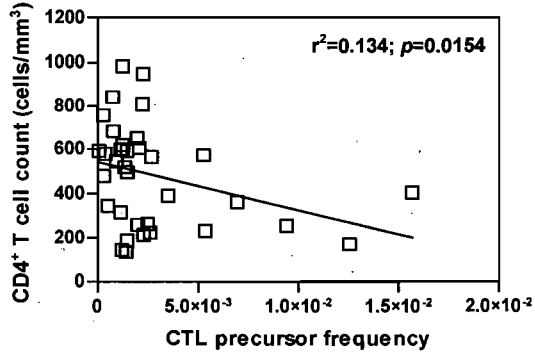
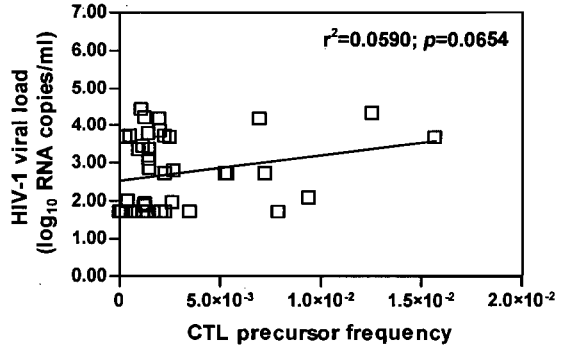


Figure 2. HIV-specific CTL precursor frequencies in study participants. Absolute CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts, HIV-1 viral load, and HIV-specific cytotoxic T lymphocyte precursor (CTLp) frequencies (all HIV antigens confounded) were determined as described under Materials and Methods. A. Correlation between CD4⁺ T cell counts and HIV-specific CTLp frequencies. B. Correlation between CD8⁺ T cell counts and HIV-specific CTLp frequencies. C. Correlation between HIV-1 viral load and HIV-specific CTLp frequencies. D. HIV-specific CTLp frequencies in subjects/time points stratified according to the presence or absence of antiretroviral treatment.

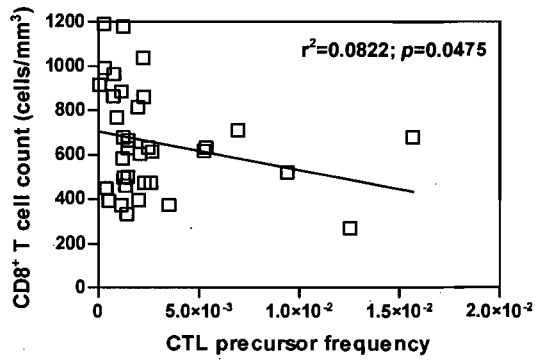
A



C



B



D

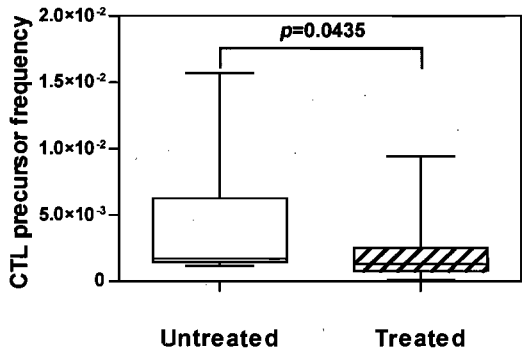


Figure 3. HIV antigenic specificity of T cell microcultures derived from study participants. HIV-specific T cell microcultures were derived and ^{51}Cr release assays were performed as described under Materials and Methods. A. Proportion of HIV-specific T cell microcultures that recognized targets expressing different HIV-1 antigens on a per patient basis. B. Proportion of HIV-specific T cell microcultures that recognized targets expressing different HIV-1 antigens on a per pregnancy basis. C. Proportions of T cell microcultures that recognized different HIV-1 antigens in subjects followed during consecutive pregnancies. IPI: inter pregnancy interval.

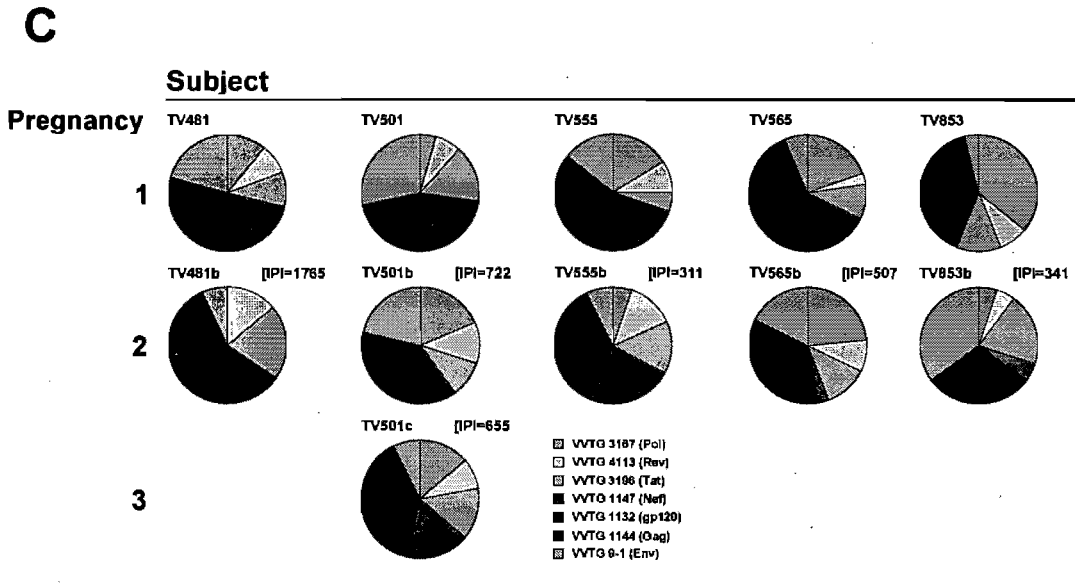
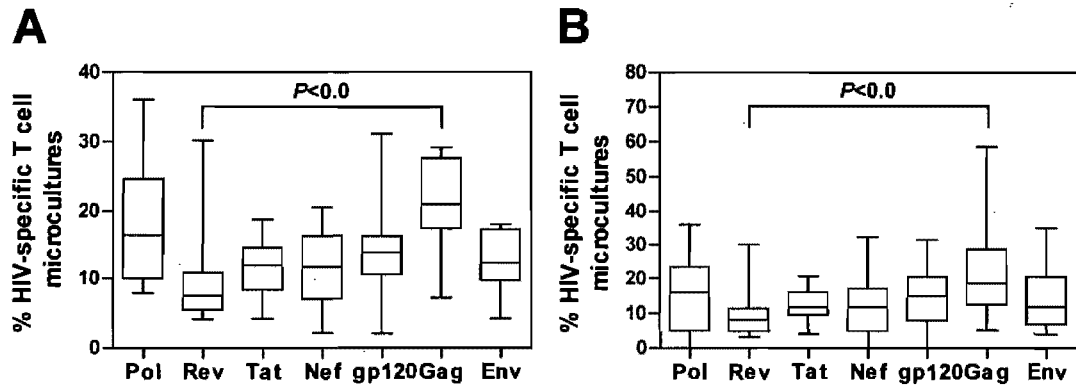
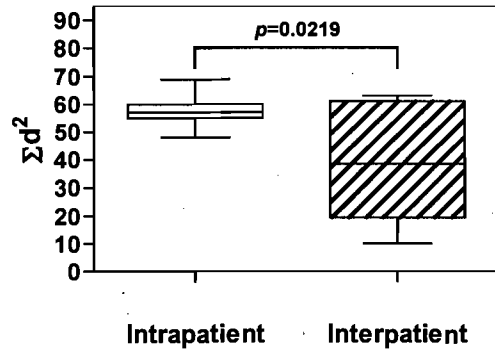
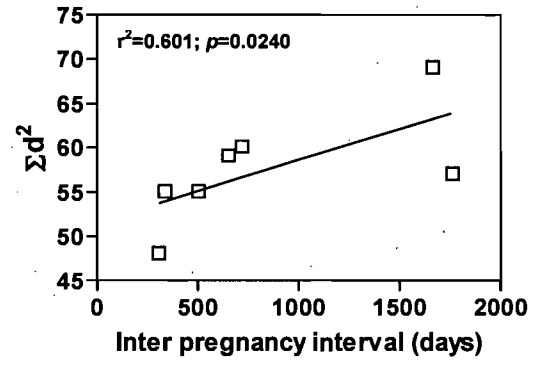


Figure 4. Hierarchy of HIV-1 antigen recognition by T cell microcultures derived from study participants. HIV-specific T cell microcultures were derived as described under Materials and Methods, and the sum of squared differences between ranks (Σd_2) was computed as described in the text. A. Pairwise comparisons of HIV-1 antigen hierarchy between consecutive pregnancies (intra-patient) or between subjects with one pregnancy (inter-patient). B. Correlation between Σd_2 and the inter-pregnancy interval (IPI) in subjects with consecutive pregnancies.

A**B**


Article 3

**EVOLUTION AND GENETIC DIVERSITY OF HIV-1 *ENV* GENE SEQUENCES
DURING PREGNANCY AND BETWEEN CONSECUTIVE PREGNANCIES**

Running head: Evolution of HIV-1 envelope during pregnancy.

Bertine S. Akouamba^{a,c}, Natacha Merindol^{a,c}, Johanne Samson^b, Normand Lapointe^{b,d},
Marc Boucher^{b,e}, and Hugo Soudeyns^{a,c,d}

^aUnité d'immunopathologie Virale and ^bCentre maternel et infantile sur le SIDA, CHU
Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; ^cDepartment of microbiology and immunology,
^dPediatrics, and ^eObstetrics & Gynecology, Université de Montréal, Montreal, Quebec,
Canada.

Address correspondence to: Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de
recherche du CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, room 6735, Montreal,
Quebec, H3T 1C5, Canada. Tel.: +1 514 345 4931 (ext. 3907). Fax: +1 514 345 4794. E-
mail 

Word count: Text: 4788 words; Abstract: 249 words.

ABSTRACT

Objective: Maternal immune responses, viral factors, and antiretroviral treatment (ART) influence the incidence of mother to child transmission (MTCT) of HIV-1, and the identity of maternal HIV-1 variants that are transmitted to the infant varies depending on the timing of transmission. To better understand the diversity and evolution of HIV-1 envelope during pregnancy and across the intergestational period, a longitudinal study of *env* gene sequences was initiated in 14 pregnant women infected with HIV-1, including 10 who were followed during consecutive pregnancies.

Methods: Nested RT-PCR and nucleotide sequence analysis of *env* V1-V3 region (positions 6426-7135) was performed in serum samples obtained in the 1st, 2^d, and 3^d trimesters of gestation.

Results: *env* V1-V3 region was successfully amplified in 12 of 14 patients. Longitudinal diversification and discrete clustering of *env* sequences as a function of trimester were observed in all cases where HIV-1 viral load was maintained below 3 log RNA copies/ml plasma for the entire duration of pregnancy (n=4). Highest intrapatient genetic distance was observed within V1, while V3 was less diversified (p=0.048). Conversely, a significant excess of nonsynonymous substitutions was only found only in V2 (p=0.019). Overall, lowest levels of sequence diversity were observed in the 3^d trimester. Finally, significant diversification and temporal clustering of *env* sequences were observed in 50% of

consecutive pregnancies and evidence suggestive of dual infection was found in 4 patients (33.3%).

Conclusion: These data illustrate the dynamics of HIV-1 *env* gene evolution and highlight differential selective pressure exerted by host immune responses during pregnancy.

INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection is characterized by a high degree of viral genetic diversity in infected individuals (1-3). Biological properties of the virus, including differences in virulence, subtype, immunogenicity, replication capacity, and quasispecies structure of the infecting inoculum, contribute to shape this diversity, as do host characteristics such as chemokine receptor polymorphisms and HLA types (4-9). Accumulating evidence suggests that these attributes influence HIV disease progression and are partly responsible for differences in control of viremia between different HIV-infected individuals (10,11,2,7).

HIV-1 envelope (Env) protein comprises conserved (C) and variable (V) regions (12). V1 and V2 are multifunctional Env domains that undergo conformational changes upon CD4 binding (13,14), modulate exposure of the coreceptor binding site (15), contribute to cell tropism and cytopathology (16), and contains epitopes recognized by neutralizing antibodies (17). The V3 loop encloses major determinants that specify differential usage of HIV-1 coreceptors (18,19), and contains epitopes that elicit both helper and cytotoxic T lymphocyte responses (20-23). V3 also serves as a major target for neutralizing antibodies (24,25).

Mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1 has been associated with several risk factors, including low levels or absence of maternal antibodies against Env (26), low CD4⁺ T lymphocyte counts (27,28), high HIV-1 viral load (29-31), and maternal HIV disease progression (32). The level of HIV-1 *env* gene diversity *in vivo* has been inversely correlated with the rate of disease progression in infected adults and children, and provides an indication of the presence of selective pressures exerted by host immune responses (33,3). Moreover, a higher risk of MTCT was associated with higher levels of antibodies binding to several envelope epitopes (34-36), and low rates of HIV-1 proviral DNA and viral *env* gene diversity were associated with *in utero* transmission of HIV-1 (37,38). This is consistent with the notion that pressure exerted by maternal autologous neutralizing antibodies (39) and cell-mediated immunity (40,41) results in the selective transmission of HIV-1 escape variants to the infant. Alternatively, MTCT of random variants could be taking place in absence of strong maternal neutralizing antibody responses (42). Interestingly, single or multiple major maternal variants are transmitted *in utero*, whereas minor variants are transmitted *intrapartum* (38,43). Taken together, these data would seem to indicate that selective pressures exerted on the HIV-1 variant spectrum by maternal immune responses vary according to the stage of pregnancy. In order to test this hypothesis, we characterized the diversity and evolution of the *env* gene throughout pregnancy and across the intergestational period in 14 women infected with HIV-1, 10 of whom were followed throughout consecutive pregnancies.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

Fourteen pregnant HIV-infected women were selected among participant to the Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) mother child cohort (CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada). Eight of those patients were followed during 2 consecutive pregnancies and 2 during 3 consecutive pregnancies. HIV-1 serologic status was determined by using the AxSYM HIV ½ gO method (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany) and confirmed by western blot. HIV-1 viral load was measured using the Versant HIV-1 RNA 3.0 assay (bDNA, Bayer, Pittsburgh, PA, USA) (detection threshold of 50 HIV-1 RNA copies per ml plasma). T cell counts were measured by flow cytometry. HIV genotyping was performed using a protocol based on sequencing of 1,497 nucleotide fragment amplified from the HIV-1 *pol* gene (positions 2253-3749) (Virco BVBA, Mechelen, Belgium) or a 524 nucleotide *pol* fragment (positions 2597-3120) and a 705 nucleotide *env* fragment (positions 6430-7135), as previously described (44). First, 2nd, and 3^d trimesters of pregnancy were defined as 1-12, 13-28, and 29-41 weeks of gestation, respectively. Gestational age, estimated date of fertilization (EDF), and expected date of confinement (EDC) were calculated based on the self-reported date of the first day of the last normal menstrual period (LMP), when available (n=17), or from fetal biometry obtained through ultrasound examination performed before 20 weeks of gestational age (n=9). Inter-pregnancy interval (IPI) was calculated as the time from delivery to the first day of the LMP of the subsequent pregnancy (54). Full informed consent was obtained from all study

participants. Standardized clinical follow-up, including ART, was provided to all women and their children. This research protocol was conducted according to the guidelines of the Ethics Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada, where all patients were enrolled and the study was completed.

Viral RNA amplification

HIV-1 viral RNA was extracted from frozen patient plasma samples using the QIAamp viral extraction mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and a 900 base pair DNA fragment spanning the Env V1-V3 region (positions 6426-7135) was amplified as previously described (45). Briefly, initial reverse transcription-PCR (RT-PCR) amplification was performed using primers E00 (5'-TAG AAA GAG CAG AAG ACA GTG GCA ATGA-3') and ES8B (5'-CAC TTC TCC AAT TGT CCC TCA-3') and QIAamp 1-step RT-PCR reagents (Qiagen). PCR conditions were 40 cycles consisting of 94°C for 30 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by a 10 min extension at 72°C. Aliquots of the RT-PCR product were then subjected to nested PCR using primers E20 (5'-GGG CCA CAC ATG CCT GTG TAC CCA CAG-3') and E115 (5'-AGA AAA ATT CCC CTC CAC AAT TA-3') and *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Nested PCR conditions were 40 cycles consisting of 94°C for 30 s, 60°C for 45 s, and 72°C for 1 min, followed by extension at 72°C for 10 min.

HIV-1 Env V1-V3 region cloning and sequence analysis

The V1-V3 nested PCR products were cloned using the Topo-TA Cloning kit (Invitrogen) and five independent recombinants were sequenced per time point using a Genetic Analyzer 3100 automated DNA sequencer and dye terminator chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were aligned using Clustal X version 1.81 (44), genetic distances were estimated by the nucleotide *p* distance method (MEGA 2.1) (36), and genetic diversification during the IPI were calculated as followed: *p* distance from the 1st trimester of the second pregnancy - the *p* distance of the 3^d trimester of the first pregnancy. Phylogenetic reconstructions were performed according to the neighbor-joining method, and 1,000 bootstrap resamplings were performed to assess tree topology (44).

Statistical analysis

The Mann-Whitney *U* test was used to assess differences between groups. The strength of association between variables was tested using linear regression analysis. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Subject clinical characteristics

The 14 HIV infected pregnant women included 8 followed during 2 consecutive pregnancies and 2 followed during 3 pregnancies thus. Thus, a total of 26 pregnancies were investigated. Of these pregnancies, 24 were treated with ART, with 12 on protease inhibitor (PI)-based regimens. 12 women initiated ART during pregnancy. Among them, 8 received PI-based regimens and 4 received nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI)-based regimens. Two patients did not receive treatment. Mean age was 32.09 ± 5.49 years (range 23.6 – 44.5) and mean CD4 and CD8 cell counts were 484.5 ± 187.3 (range 147.0 – 844.5) and 611.0 ± 196.9 (range 306.0 – 1054.0) respectively. 7 patients (50%) were infected with non- clade B viruses, including subtypes A, C, D, CRF05_DF and an unclassified recombinant (44). Furthermore, there was evidence of dual infection in 4 patients (TV795 TV1057 TV721 and TV1079). Results obtained with TV795 and TV1057 were consistent with dual intraclade infection with 2 distinct subtype B lineages. The profile observed in subject TV721 was consistent with dual interclade infection with subtypes A and J, while that observed in subject TV1079 was consistent with the involvement of subtypes A and CRF02_AG. Patients TV721 and TV1079 arboring dual interclade infection were excluded from the genetic distances analysis.

Genetic evolution of *env* V1-V3 region throughout the pregnancy and during inter gestational period

Env V1-V3 was successfully sequenced in 12 of the 14 pregnant women, thus a total of 19 pregnancies were studied. 1 of 2 successive pregnancies also failed in 2 patients. This failure can be related to the undetectable plasma viral load found in these patients. The phylogenetic analysis showed a clear clustering of sequences per trimester in 21% (4/19) of pregnancies (TV463, TV507, TV545 and TV981), with sequences from each trimester forming a monophyletic group (figure 1A). Mean plasma viral load was 2.71 ± 0.49 (range from 2.03 to 3.1) in these 4 patients. This clustering was also observed in 57.9% (11/19) of studied pregnancies but early viral strains persisted throughout pregnancy in 8 of them (TV457, TV795, TV555, TV721, TV733, TV1091, TV1079 and TV755) (figure 1B). Virus isolated from the last visit formed a distinct cluster in 3 pregnancies (TV479, TV1079 and TV501) while sequences from 26.3% (4/19) of pregnancies (TV481, TV689, TV1057 and TV1069) didn't form distinct clusters and did not show a pattern of viral evolution throughout pregnancy (figure 1C). Interestingly, mean viral load in these patients was 3.65 ± 0.70 (range from 2.6 to 4.04). These results suggested a longitudinal evolution of viral population in women who controlled viral replication. Finally, among the patients for whom Env V1-V3 was sequenced, 6 were followed during successive pregnancies. We were thus able to explore viral evolution between pregnancies (figure 1D). There was a well defined clustering of *env* sequences per pregnancy in 66% (4/6) of studied subjects (TV481-TV1057, TV479-TV689, TV925-TV1079 and TV555-TV721). Sequences from

the last trimester of the first pregnancy were detected at the beginning of the second one in TV555-TV721. 16.6% (1/6) of subjects with consecutive pregnancies showed a distinct clustering of sequences from the first pregnancy compared to those from the second and the third pregnancy (TV501-TV795-TV1069). In contrast, 16% (1/6) of studied subjects didn't manifest this kind of clustering (TV981-TV1091). This data indicated viral evolution during the IPI suggestive of an ongoing immune selective pressure changes between consecutive pregnancies.

Genetic diversification of *env* V1-V3 region and effect of ART

Inter-sample genetic diversity was greater within the V1 loop (range from 1.3% to 94%; mean, 19.7%) than V2 (range: 1.2% to 24.3%; mean: 9.1%) and V3 (range: 0% to 27.2%; mean: 5.3%). Overall genetic diversity was significantly higher in V1 than V3 ($p=0.0485$, Mann Whitney U test) (Figure 2A). There was a trend towards a negative correlation between plasma viral load and either Env V2 and V3 regions diversity (Figure 2B), indicating that low *env* diversity was not due to low input of HIV RNA in the sample that we retested. Positive correlation between CD4 T cell counts and the genetic diversification of V2, and negative correlation with V1 we observed were not significant. Taken together, this data suggests that the genetic diversity observed in V2 could result from immune selective pressure, in contrast with that observed in V1. In addition, nucleotide sequence diversity within V3 between consecutive pregnancies positively correlated with the duration of IPI in subjects with multiple pregnancies ($r^2=0.79$; $p=0.0423$), indicating that

longer intervals were associated with more nucleotide diversification in V3. This kind of association was not found in V1 or V2 regions.

To explore whether antiretroviral treatment had an impact on the diversity of viral populations, we compared genetic diversity between treated and untreated time points. The entire V1-V3 region is less affected by this genetic diversity (Figure 2C). This can be related to the presence of more conserved regions like C2 between V2 and V3 loops. As described in Figure 1, greatest Env diversity was observed within V1 (Figure 2C). ART treatment seemed to increase this diversity in all Env regions studied.

Viral genetic diversity throughout pregnancy

To evaluate the progression of viral diversity during the course of pregnancy and to estimate the impact of ART on this progression, we studied the genetic variation of *env* V1, V2 and V3 before pregnancy and in the first, second and third trimesters of pregnancy. A best estimate of the natural course of viral evolution was obtained in absence of ART (Figure 3A). Viral diversity seemed to decrease strongly in the third trimester of pregnancy ($p=0.028$, Mann Whitney *U* test) for all region studied and in the second trimester for V3 loop. Highest diversity was observed before pregnancy but also at the second trimester in the case of V1. Furthermore, ART increased viral diversity in all stages of pregnancy but most importantly in the third trimester (figure 3B). In spite of the limited number of subjects examined, these data indicate that viral populations are more homogeneous in the

third trimester and that ART might increase virus population complexity throughout pregnancy, particularly in the third trimester.

Potential effect of maternal immune selective pressure effect on *env* V1-V3 region diversification

To underscore the impact of adaptive evolution on viral genetic diversity (maternal immune positive selection), the ratio of the rate of nonsynonymous (amino acid changing, dN) to the rate of synonymous (silent, dS) substitution between protein-coding DNA sequences was compared. A dN/dS value less than 1 suggests mutations that occur randomly without selection or conservation and a ratio greater than 1 indicate adaptive selection. Lowest dN/dS values were observed in V1 (mean=0.47) and V3 (mean=0.38), while greatest values were found in V2 (mean=0.82; $p=0.0196$) (figure 4A). Overall, only 1/12 value was > 1 in V1, whereas 4/14 values were > 1 in V2. The V2 dN/dS ratio negatively correlated with CD4⁺ T cell counts ($r^2=0.269$; $p=0.0393$) (figure 4B). These data indicate that the greater genomic diversity observed within V1 was caused by synonymous substitutions while V2 is less conserved.

DISCUSSION

Maternal plasma viral load has been unambiguously associated with MTCT of HIV-1. However, cumulative evidence suggests that high maternal viral load is insufficient to fully explain all cases of MTCT (46). Because the level of HIV-1 *env* gene diversity has been associated with *in utero* transmission, a longitudinal analysis of HIV *env* gene throughout the pregnancy and across the IPI was performed.

This phylogenetic analysis revealed showed a longitudinal evolution of Env V1-V3 sequences in 15 of 19 pregnancies and the persistence of the earliest detected variants in 7 of these cases. Sequences from 4 of 15 pregnancies, in which maternal viral load was below 3 Log, formed monophyletic groups in each trimester. This data contrasted with those described by Briant *et al.* (47) who reported the presence of heterogeneous sequence populations in several maternal samples collected during pregnancy. This difference can be attributed to the limited number of pregnancies examined in that particular study ($n=4$) instead of 19 in our study. In the present study, heterogeneous sequences were also observed in 4 of 19 pregnancies. A clear grouping of Env V1-V3 sequences per pregnancy in some women with multiple pregnancies highlights ongoing viral evolution between pregnancies. Taken together, this finding indicates the presence of intra-host selective pressures that drive evolution of viral population throughout the pregnancy and between pregnancies.

The V3 domain of Env was the focus of other studies on HIV-1 envelope gene diversity and MTCT (36-38, 47, 48). Because V1 and V2 hypervariable regions vary independently in vivo and can display more genetic variability than the V3 loop (49-51), V1 and V2 were included in the present study. Overall, the greatest genetic diversity was found in the V1 domain and there is no evidence to suggest that this diversification is related to immune selective pressure based on dN/dS ratio data. Interestingly, even if the lowest genetic distances were observed in V3 region, the largest magnitude of nucleotide diversity between consecutive pregnancies was associated with longer IPI in this domain. These results are in agreement with those described by Lamers *et al.*, (49) who found higher genetic distances within V1 compared with V2 domain. The lowest nucleotide variation found in V3 is in agreement with changes in coreceptor usage in some pregnant women from Cameroon (55). Furthermore, this is so far, the first report of viral genetic evolution during IPI and this can be related to V3 diversification. However, further investigations will be needed to determine the impact of this dynamic on coreceptor usage. ART resulted in a trend towards increasing viral diversity in all Env regions. These data reinforce the beneficial effect of ART in preventing MTCT of HIV, considering the association between low *env* diversity and MTCT of HIV (37, 38). Negative correlation between dN/dS ratio and CD4 T cell counts suggests the effect of immune selective pressure in V2 domain. We can not exclude the possibility of viral genomic drift based on dN/dS ratio data. Anyway future work based on HIV *env* genetic diversity should include analysis of the V2 region.

Finally, genetic diversity and number of maternal HIV variants transmitted have been reported to differ depending of the timing of transmission. We assessed *env* genetic diversity throughout pregnancy and found lowest diversity in the third trimester in absence of ART for all Env domains studied. This can explain the previously reported *intrapartum* transmission of minor maternal variants (38, 43). ART increased viral diversity in all stage of pregnancy and more importantly during the third trimester. Thus by increasing viral diversity during the third trimester, as which time HIV-1 MTCT mainly occurs (52, 53), ART further contribute to the prevention of MTCT.

In summary, this study evidences the dynamic of HIV viral population in the course of pregnancy and the IPI. These data also emphasize the importance to include the *env* V2 domain in any analysis of HIV-1 genetic diversity and underline for the first time another possible way by which ART may prevent MTCT of HIV-1. We hypothesize that by restoring immune competence ART increases viral diversity during pregnancy and then reduces the incidence of MTCT. Further studies regarding maternal anti HIV-Env humoral and cellular immunity throughout pregnancy will need to be conducted to confirm this hypothesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank all study participants, as well as Martine Caty, Silvie Valois, and Ampha Khammy for expert technical assistance. Supported by grants from the

CIHR-Health Canada Research Initiative on HIV-AIDS (grant no HOP-75352) and by an infrastructure grant from le Réseau SIDA-maladies infectieuses of le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). B.S.A. was the recipient of a Graduate Scholarship from le Ministère de l'éducation du Gabon. H.S. is a Junior-II Scientist of FRSQ.

REFERENCES

1. Saag MS, Hahn BH, Gibbons J, Li Y, Parks ES *et al.*: Extensive variation of the human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Nature* 1988; 334:440-444.
2. Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D *et al.*: Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73:10489-10502.
3. Wolinsky SM, Korber BTM, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ *et al.*: Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 1996; 272:537-542.
4. Ritola K, Pilcher CD, Fiscus SA, Hoffman NG, Nelson JA *et al.*: Multiple V1/V2 env variants are frequently present during primary infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2004; 78:11208-11218.
5. Sagar M, Kirkegaard E, Long EM, Celum C, Buchbinder S *et al.*: Human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) diversity at time of infection is not restricted to certain risk groups or specific HIV-1 subtypes. *J Virol* 2004; 78:7279-7283.

6. Sagar M, Lavreys L, Baeten JM, Richardson BA, Mandaliya K *et al.*: Infection with multiple human immunodeficiency virus type 1 variants is associated with faster disease progression. *J Virol* 2003; 77: 12921-12926.
7. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA *et al.*: Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 1997; 277:959-965.
8. Spira S, Wainberg MA, Loomba H, Turner D and Brenner BG. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:229-240.
9. Trachtenberg E, Korber BE, Sollars C, Kepler TB, Hraber PT *et al.*: Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat Med* 2003; 9:928-935.
10. Mani I, Gilbert P, Sankale JL, Eisen G, Mboup S *et al.*: Inpatient diversity and its correlation with viral setpoint in human immunodeficiency virus type 1 CRF02_A/G-IbNG infection. *J Virol* 2002; 76:10745-10755.
11. MarMarkham RB, Wang WC, Weisstein AE, Wang Z, Munoz A *et al.*: Patterns of HIV-1 evolution in individuals with differing rates of CD4 T-cell decline. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:12568-12573.
12. Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F *et al.*: Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol* 1987; 61:570-578.

13. Ross TM and Cullen BR. The ability of HIV-1 type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in conjunction with a CCR-5 tropic V3 loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7682-7686.
14. Wyatt R, Sullivan N, Thali M, Repke H, Ho D, Robinson J *et al.*: Functional and immunologic characterization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins containing deletions of the major variable regions. *J Virol* 1998; 67:4557-4565.
15. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J *et al.*: The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998; 393: 705-711.
16. Palmer CP, Balfe P, Fox D, May JC, Frederiksson R, Benveniste RE *et al.*: Functional characterization of the V1V2 region of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 1996; 220:436-449.
17. Mckeating JA, Shotton C, Cordell J, Graham S, Balfe P *et al.*: Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to linear and conformation-dependent epitopes within the first and second variable domains of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993; 67:4932-4944.
18. Cho MW, Lee MK, Carney MC, Berson JF, Doms RW *et al.*: Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *J Virol* 1998; 72:2509-2515.

19. Speck R, Wehrly K, Platt E, Atchison R, Charo I *et al.*: selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J Virol* 1997; 71:7136-7139.
20. Clerici M, Lucey DR, Zajac RA, Boswell RN, Gebel HM, *et al.* Detection of cytotoxic T lymphocytes specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individual. *J Immunol* 1991; 146:2214-2219.
21. Takahashi H, Nakagwa Y, Pendleton CD, Houghten RA, Yokomuro K, *et al.* Induction of broadly cross-reactive cytotoxic T cells recognizing an HIV-1 envelope determinant. *Science* 1992; 255:333-336.
22. Palker TJ, Matthews TJ, Langlois A, Tanner ME, Martin ME *et al.* Polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes. *J Immunol* 1989; 142:3612-3619.
23. Takahashi H, Germain RN, Moss B, and Berzofsky JA. An immunodominant class I-restricted cytotoxic T lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type 1 induces CD4 class II-restricted help for itself. *J Exp Med* 1990; 171:571-576.
24. Ho DD, Sarngadharan MG, Hirsch MS, Schooley RT, Rota TR, *et al.* Human immunodeficiency virus neutralizing antibodies recognizing several conserved domains on the envelope glycoproteins. *J Virol* 1987; 61:2024-2028.
25. Javaherian K, Langlois AJ, LaRosa GJ, Profy AT, Bolognesi DP, *et al.* Broadly neutralizing antibodies elicited by hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* 1990; 250:1590-1593.

26. Rossi P, Moschese V, Broliden PA, Fundarò C, Quinti I, *et al.* Presence of maternal antibodies to human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp120 epitopes correlates with the uninfected status of children born to seropositive mothers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:8055-8058.
27. St Louis ME, Kamenga M, Brown C, Nelson AM, Manzila T, *et al.* Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic, and placental factors. *JAMA* 1993; 269: 2853-2859.
28. Ioannidis JPA, Abrams EJ, Ammann A, Bulterys M, Goedert LG, Korber BT, *et al.* Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads < 1000 copies/mL. *J Infect Dis* 2001; 183: 539-545.
29. Mandelbrot L, Mayaux MJ, Bongain A, Berrebi A, Moudoub-Jeanpetit Y, Benifla JL, *et al.* Obstetric factors and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French perinatal cohorts. *AM J Obstet Gynecol* 1996; 175: 661-667.
30. Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, Todd JA, Herman SA, McSherry GD, *et al.* Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1996; 335: 1621-1629.
31. The international perinatal HIV group. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1999; 340: 977-987.

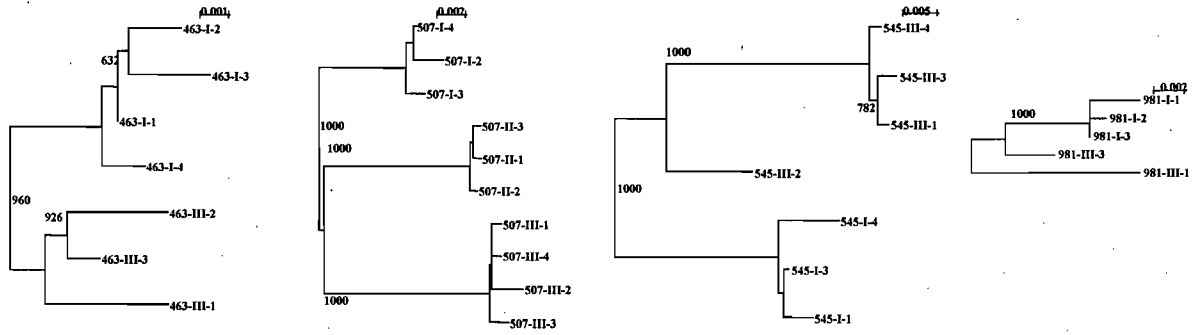
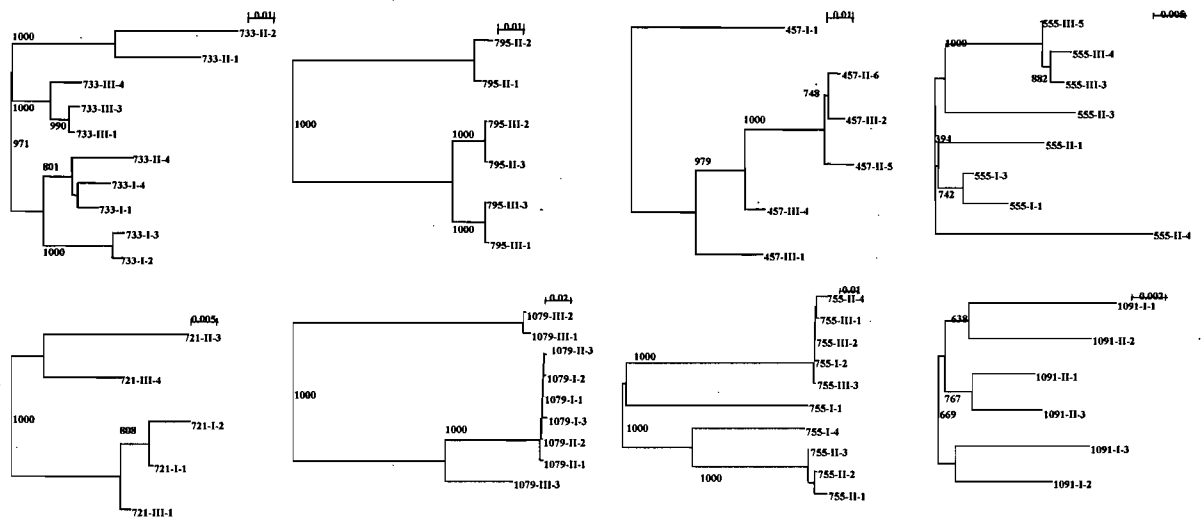
32. Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TAC, Burchett SK, *et al.*: Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341: 394-402.
33. Ganeshan S, Dickover RE, Korber BT, Bryson YJ and Wolinsky SM: Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. *J Virol* 1997; 71:663-677.
34. Guevara H, Casseb J, Zijenah LS, Mbizvo M, Ocegüera LF 3rd, *et al.* Maternal HIV-1 antibody and vertical transmission in subtype C virus infection. *JAIDS* 2002; 29:435-440.
35. Lallemand M, Baillou A, Lallemand Lecoœur S, Nzingoula S, Mampaka M, *et al.* Maternal antibody response at delivery and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in African women. *Lancet* 1994; 343:1001-1005.
36. Barin F, Gonzague J, Brunet S, Ngo-Giang-Huong N, Weerawatgoompa S *et al.* Revisiting the role of neutralizing antibodies in mother-to-child transmission of HIV-1. *J Infect Dis* 2006; 193:1504-1511.
37. Arroyo MA, Tien H, Pagan M, Swanstrom R, Hillyer GV, *et al.* Virologic risk factor for vertical transmission of HIV type 1 in Puerto Rico. *Aids Res Hum Retrovir* 2002; 18:447-460.

38. Dickover RE, Garratty EM, Plaeger S and Bryson YJ: Perinatal transmission of major, minor, and multiple maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in utero and intrapartum. *J Virol* 2001; 75:2194-2203.
39. Kliks SC, Wara DW, Landers DV and Levy JA: Features of HIV-1 that could influence maternal-to-child transmission. *JAMA* 1994; 272:467-474.
40. Plaeger S, Bermudez S, Mikyas Y, Harawa N Dickover R *et al.*: Decreased CD8 cell-mediated viral suppression and other immunologic characteristics of women who transmit human immunodeficiency virus to their infants. *J Infect Dis* 1999; 179:1388-1394.
41. Wilson CC, Brown RC, Korber BT, Wilkes BM Rhul DJ *et al.*: Frequent detection of escape from cytotoxic T-lymphocyte recognition in perinatal human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transmission: the Ariel Project for the Prevention of Transmission of HIV from Mother to Infant. *J Virol* 1999; 73:3975-3985.
42. Dickover RE, Garratty EM, Herman SA, Sim AS, Plaeger S *et al.*: Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission: effect of maternal zidovudine treatment on viral load. *JAMA* 1996; 275:599-605.
43. Verhofstede C, Demecheleer E, De Cabooter N, Gaillard P, Mwanyumba F *et al.* 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; 77:3050-3057.

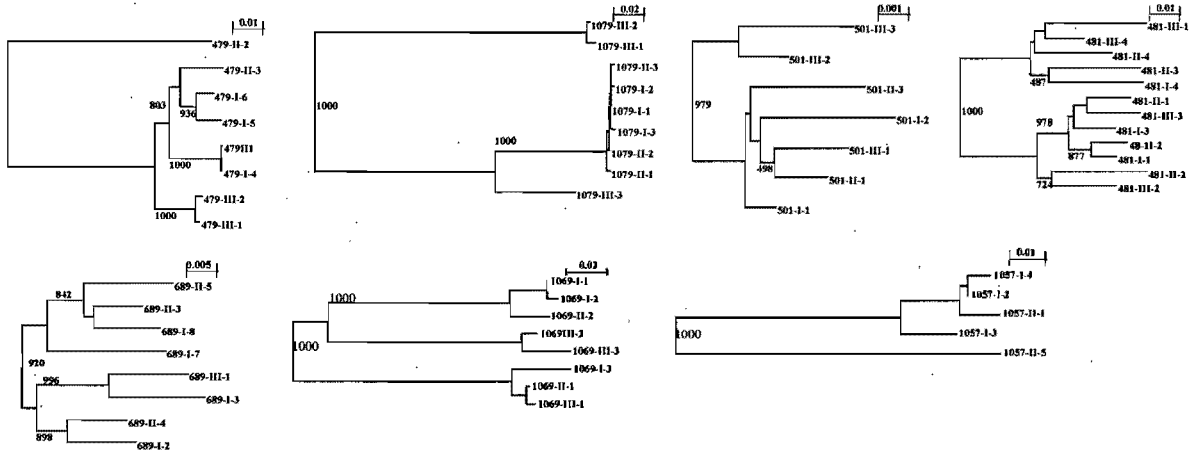
44. Akouamba BS, Viel J, Charest H, Merindol N, Samson J, Soudeyns H, *et al.*: HIV-1 genetic diversity in antenatal cohort, Canada. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1230-1234.
45. Trouplin V, Salvatori F, Cappello F, Obry V, Brelot A *et al.*: Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J Virol* 2001; 75:251-259.
46. Cao Y, Krogstad P, Korber BT, Koup RA, Muldoon M, *et al.* Maternal HIV-1 viral load and vertical transmission of infection: The Ariel Project for the prevention of HIV transmission from mother to infant. *Nat Med* 1997; 3:549-552.
47. Briant L, Wade CM, Puel J, Leigh Brown AJ, and Guyader M. Analysis of envelope sequence variants suggests multiple mechanisms of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1995; 69:3778-3788.
48. Joos B, Trkola A, Fischer M, Kuster H, Rusert P, *et al.* Low human immunodeficiency virus envelope diversity correlate with low in vitro replication capacity and predicts spontaneous control of plasma viremia after treatment interruption. *J Virol* 2005; 79:9026-9037.
49. Lamers SL, Sleasman JW, She JX, Barrie KA, Pomeroy SM, *et al.* Independent variation and positive selection in *env* V1 and V2 domains within maternal-infant strains of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. *J Virol* 1993; 67:3951-3960.
50. Kusumi K, Conway B, Cunningham S, Berson A, Evans C *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 envelope gene structure and diversity *in vivo* and after cocultivation *in vitro*. *J virol* 1992; 66:875-885.

51. Pedroza ML, Chenciner N, and Wain-Hobson S. Complex inpatient sequence variation in the V1 and V2 hypervariable regions of the HIV-1 gp120 envelope sequence. *Virology* 1992; 191:837-845.
52. Lallemand M, Jourdain G, Le Coeur S, Kim S, Koetsawang S, *et al.* A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. Perinatal HIV Prevention Trial (Thailand) Investigators. *N Engl J Med* 2000; 343:982-991.
53. Rouzioux C, Costagliola D, Burgard M, Blanche S, Mayaux MJ, *et al.* Timing of mother-to-child HIV-1 transmission depends on maternal status. The Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *AIDS* 1993; 7: S49-52.
54. Nguyen RHN, and Wilcox A. Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms. *J Epidemiol Community Health* 2005; 59:1019-1021.
55. Tscherning-Casper C, Vödrös D, Menu E, Aperia K, Fredriksson R *et al.* Coreceptor usages of HIV-1 isolates representing different genetic subtypes obtained from pregnant Cameroonian women. European Network For In Utero Transmission of HIV-1. *JAIDS* 2000; 24:1-9.

Figure 1. Phylogenetic analysis of env sequences during pregnancy and the inter-pregnancy intervals in study participants. A 705 nucleotide fragment spanning HIV-1 *env* V1-V3 regions were amplified from the first (I), 2nd (II), and 3^d (III) trimesters of pregnancy, subcloned, and their nucleic acid sequence was determined as described under materials and methods. A. Pregnancies with clustering of *env* V1-V3 sequences per trimester. B. Pregnancies with persistent earlier sequences. C. Pregnancies with no clustering of *env* sequences. D. Sequences from consecutive pregnancies in subjects with multiple pregnancies. Each pregnancy is assigned by TV plus a number X (TVX) and consecutive pregnancies are named TVX-TVY for 2 or TVX-TVY-TVZ for 3 pregnancies (the lower number X representing the first pregnancy , Y the second and Z the third one).

A**B**

C



D

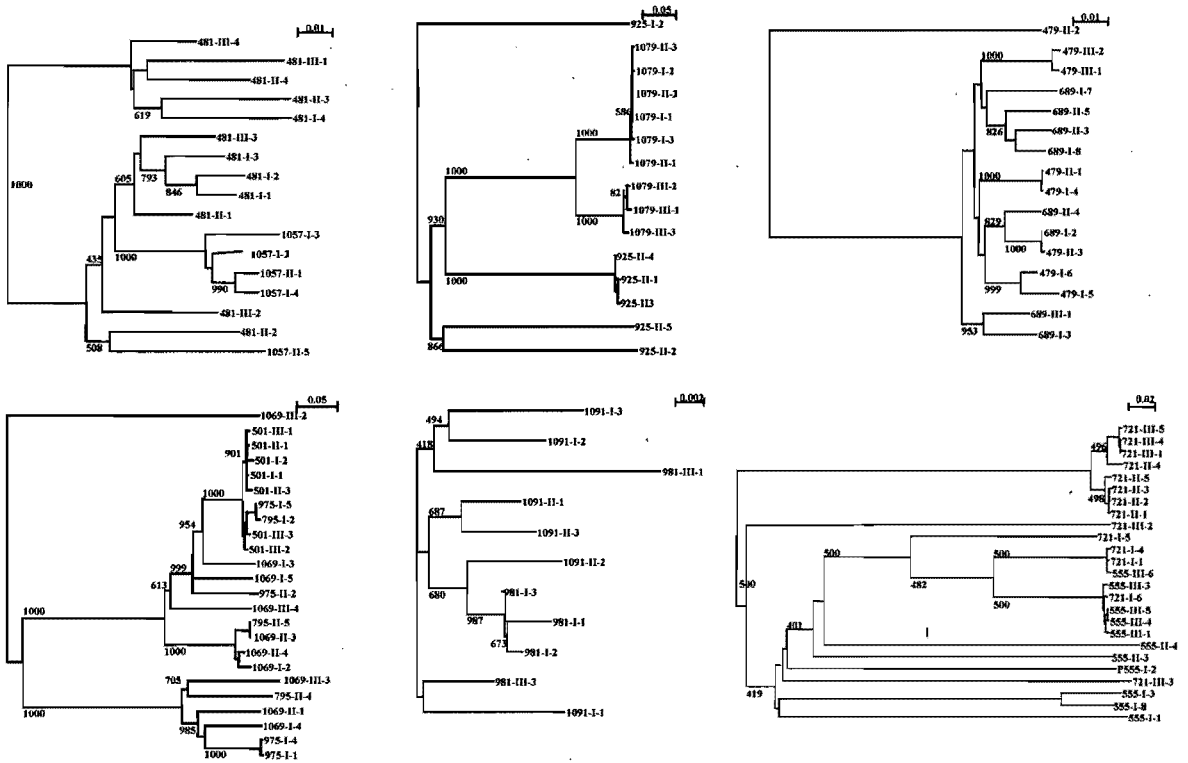
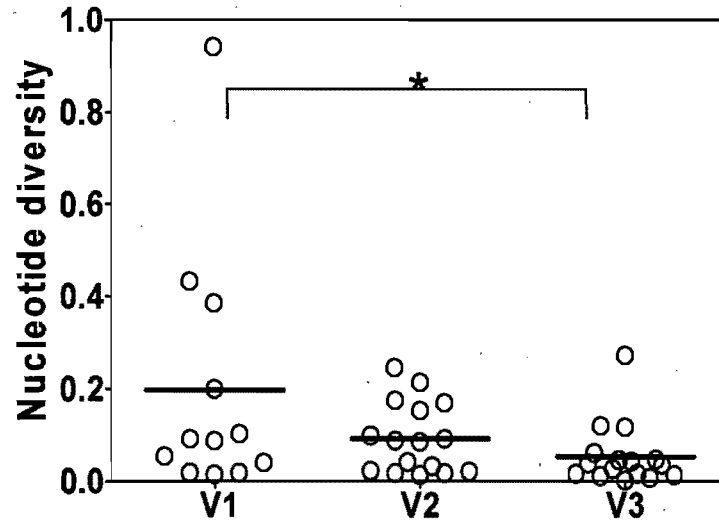
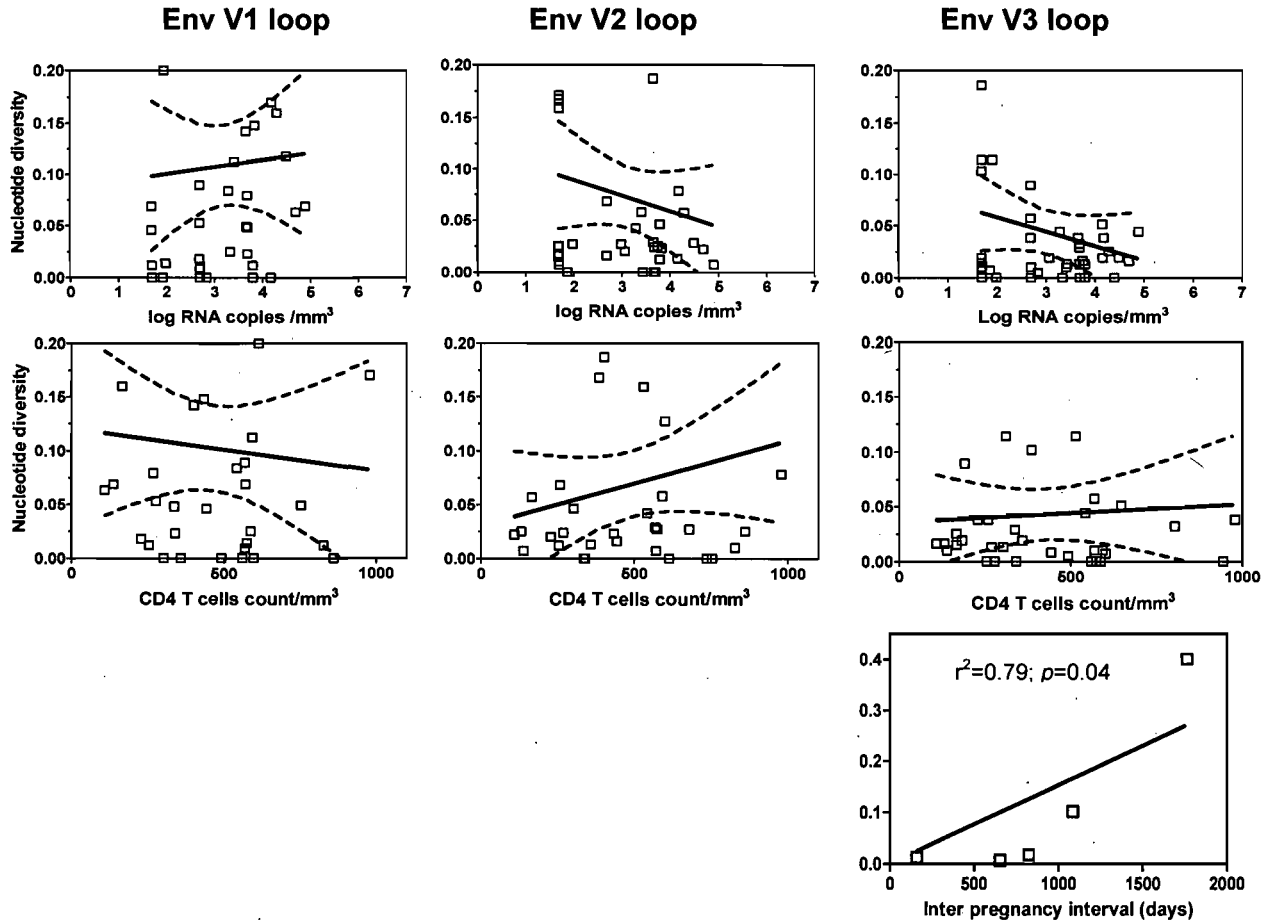


Figure 2. Analysis of HIV-1 variants diversity in study participants. A. Mean genetic (p) distance within V1, V2 and V3 *env* hyper variable regions. B. Correlation between mean genetic (p) distance per time point and either viral load, CD4⁺ T cell counts or inter-pregnancy intervals (IPI). C. Impact of ART in genetic diversity of *env* domains, time points are stratified by untreated (open bars) and treated (vertical hatch). Error bars represents standard error of the mean. Asterisk indicates significant differences at $p < 0.005$ level.

A



B



C

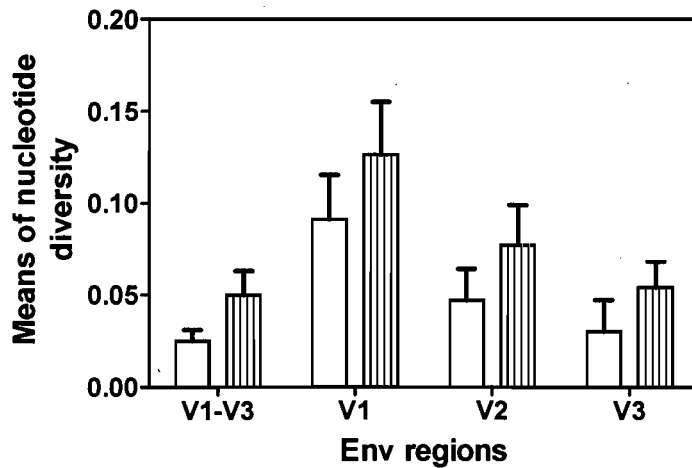
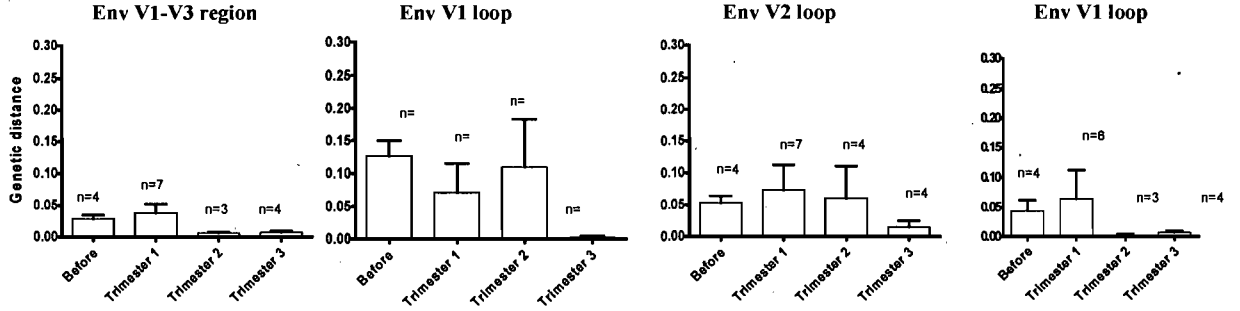


Figure 3. Analysis of HIV-1 viruses diversity throughout the pregnancy in study participants. Mean genetic (p) distance during the course of pregnancy in the entire study group. A. Untreated time point (open bars). B. Treated time points (vertical hatch). The number of time points available per trimester is represented by (n). Error bars represents standard error of the mean.

A. Untreated



B. Treated

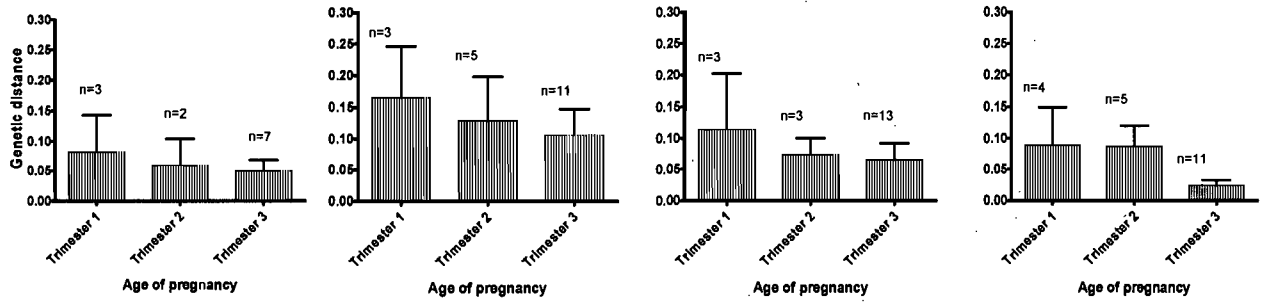
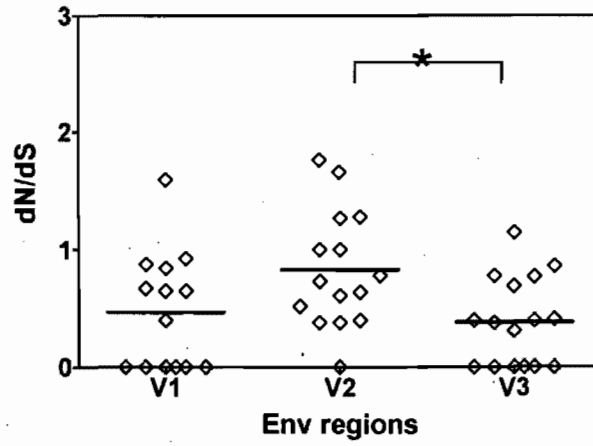
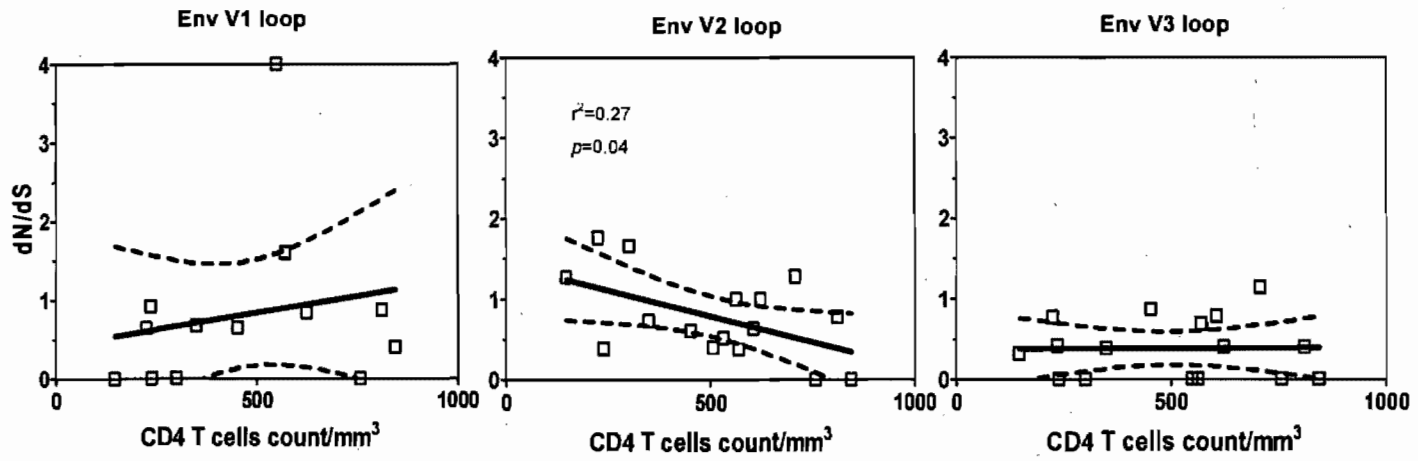


Figure 4. Analysis of dN/dS ratio in HIV-1 Env variants in study participants. A. dN/dS ratio per time point in V1, V2 and V3 *env* domains. **B.** Correlation between dN/dS ratio and CD4⁺ T cell counts. Asterisk indicates significant differences at p<0.005 level.

A



B



Conclusion

Article 1

Notre étude se rapportant à la diversité génétique du VIH-1 a démontré, par le séquençage du gène *pol* du VIH-1 chez 103 femmes enceintes recevant des soins prénataux au CHU Sainte Justine (81.1%), que 57.3% d'entre elles étaient infectées par les virus de clade B. Cette prévalence de variants B est compatible avec la prédominance de cette clade en Amérique et dans les caraïbes, d'où provenaient 57.3% des patientes. Nous avons observé que les séquences *pol* des femmes originaires des caraïbes (incluant Haïti, Jamaïque et République Dominicaine) formaient des regroupements distincts de ceux constitués des séquences des patientes provenant d'Amérique du Nord et central (Canada et Mexique) (Figure supplémentaire 1). Cela, suggère fortement l'existence d'une subdivision des virus VIH-1 de sous type B par régions géographiques. Fait intéressant, avant notre étude, Kalish *et al.*, avaient démontré la circulation de 2 types de variants B dans une population d'utilisateurs de drogues injectables en Thaïlande (Kalish et al. 1994). Très récemment, Gilbert *et al.* ont décrit une diversité des variants B du VIH plus grande chez les personnes originaires d'Haïti comparativement aux sous types B circulant dans d'autres régions. Par ailleurs, cette même étude a observé que les séquences *env* originaires d'Haïti formaient des regroupements distincts de ceux constitués de séquences provenant d'Amérique du Nord (Gilbert et al. 2007). Une telle subdivision pourrait avoir un intérêt non seulement pour le développement de vaccins, mais aussi pour une meilleure compréhension de la pathogenèse associée aux variants de clade B du VIH-1.

42,7% des patientes étaient infectées par des virus de sous types non-B du VIH-1. Cela représente une prévalence significativement supérieure à celle publiée en 2003 par l'Agence de Santé Publique du Canada, qui rapportait 8,9% cas d'infections par les variants non-B sur 805 échantillons séquencés (Agence de Santé Publique du Canada, 2003). Cette énorme différence peut être imputable à la période couverte par cette dernière étude, soit de 1996 à 2000. En effet, selon les données d'Immigration Canada, le nombre de nouveaux

arrivants, stable entre 1996 et 1999, a augmenté à partir de 1999 pour atteindre un pic de croissance en 2001 (Citoyenneté et Immigration Canada, 2002). Notre étude, réalisée sur une cohorte de femmes recrutées entre 1999 et 2003, concerne de fait une période de forte immigration. Une autre explication serait le fait que les données de Santé Canada ont été obtenues sur des populations provenant des provinces moins affectées par l'immigration (Colombie-Britannique, Saskatchewan, Manitoba, Terre Neuve et Alberta), alors que notre étude concernait Montréal, l'une des villes accueillant plus d'immigrants au Canada (Citoyenneté et Immigration Canada, 2002).

Il est aussi important de souligner que la prévalence de variants non-B dans notre étude (42,7%), était la plus forte rapportée à l'époque en Amérique du Nord, même en considérant les groupes d'études constitués de militaires américains (Brodine et al. 1999; 2003; Delwart et al. 2003). En 2006, Lin *et al.* ont trouvé une proportion de 43.4% de personnes infectées par des virus de sous types non-B dans une population d'immigrants vivant à New York (Lin et al. 2006).

Par ailleurs, le degré de diversité génétique observée dans notre étude est le plus fort jamais rapporté en Amérique du Nord. Plus intéressant encore, 4 de nos séquences *pol* n'ont démontré aucune homologie avec les séquences de références disponibles, ce qui suggère qu'elles pourraient représenter de nouveaux sous-types du VIH-1 ou des formes complexes recombinantes (URFs, CRFs). Depuis la publication de cet article, le séquençage du génome complet de certains de ces virus, indique de fait qu'il s'agit d'URFs dans 2 des 4 cas (Kouzhaya et al, données non publiées). De plus, le fait que ces patientes soient originaires de la même région d'Afrique Centrale (République Démocratique du Congo, Rwanda, et République du Congo) appuie cette indication. En effet, une importante diversité et complexité des variants VIH (incluant les souches inconnues) a été décrite en République Démocratique du Congo (Vidal et al. 2000).

Enfin, nous avons trouvé un total de 97.7% de virus non-B chez les femmes d'origine africaine. Dans tous les cas, l'identité des sous types correspondait aux clades

circulant dans les pays d'origine de ces patientes. Ce qui, indique que ces femmes étaient probablement infectées avant leur arrivée au Canada. L'un des points forts de cette étude a été de démontrer que la date d'introduction des clades non-B dans notre cohorte coïncidait avec l'arrivée des femmes en provenance de l'Afrique Centrale (Figure supplémentaire 2). Nous avons aussi noté 2 pics d'arrivée au Canada, un en 1997 et un autre en 2001. En tenant compte du fait que 34 (77.3%) de ces femmes étaient des réfugiées, nous avons établi que l'introduction des variants non-B était associée au génocide du Rwanda et aux conflits armés en République Démocratique du Congo (United Nations High Commissioner for Refugees, 2000; Direction de la population et de la recherche, 2003). Une prévalence croissante d'infections par des sous types non-B a été rapportée en Europe et en Amérique (Fransen et al. 1996; Alaeus et al. 1997; Boni et al. 1999; Weidle et al. 2000; Couturier et al. 2000; Esteves et al. 2002; Chaix et al. 2003). La contribution des voyages internationaux et de l'immigration des populations africaines à la dissémination rapide de ces variants dans le monde est de mieux en mieux établie. Ainsi, notre étude a pu démontrer, sans aucun doute, que de multiples clades du VIH-1 sont en train d'être introduits dans un grand centre urbain d'Amérique du Nord suite à l'influx de nouveaux arrivants d'origine africaine.

L'une des particularités de cette étude est qu'elle a été réalisée sur une population de femmes enceintes ce qui, loin d'être un inconvénient, représente un bon outil pour le suivi de la dispersion et de l'évolution des sous types du VIH-1 dans la population hétérosexuelle en général. De plus, le fait qu'au Canada les femmes enceintes bénéficient de suivis prénataux gratuits, universels et rigoureux (impliquant le dépistage du VIH) facilite l'accessibilité des chercheurs ou des organismes compétents à cet outil de recherche. Pour ces raisons, les cohortes prénatales peuvent constituer d'importants sites sentinelles pour le suivi de l'introduction et de l'évolution des nouveaux variants viraux dans les pays industrialisés.

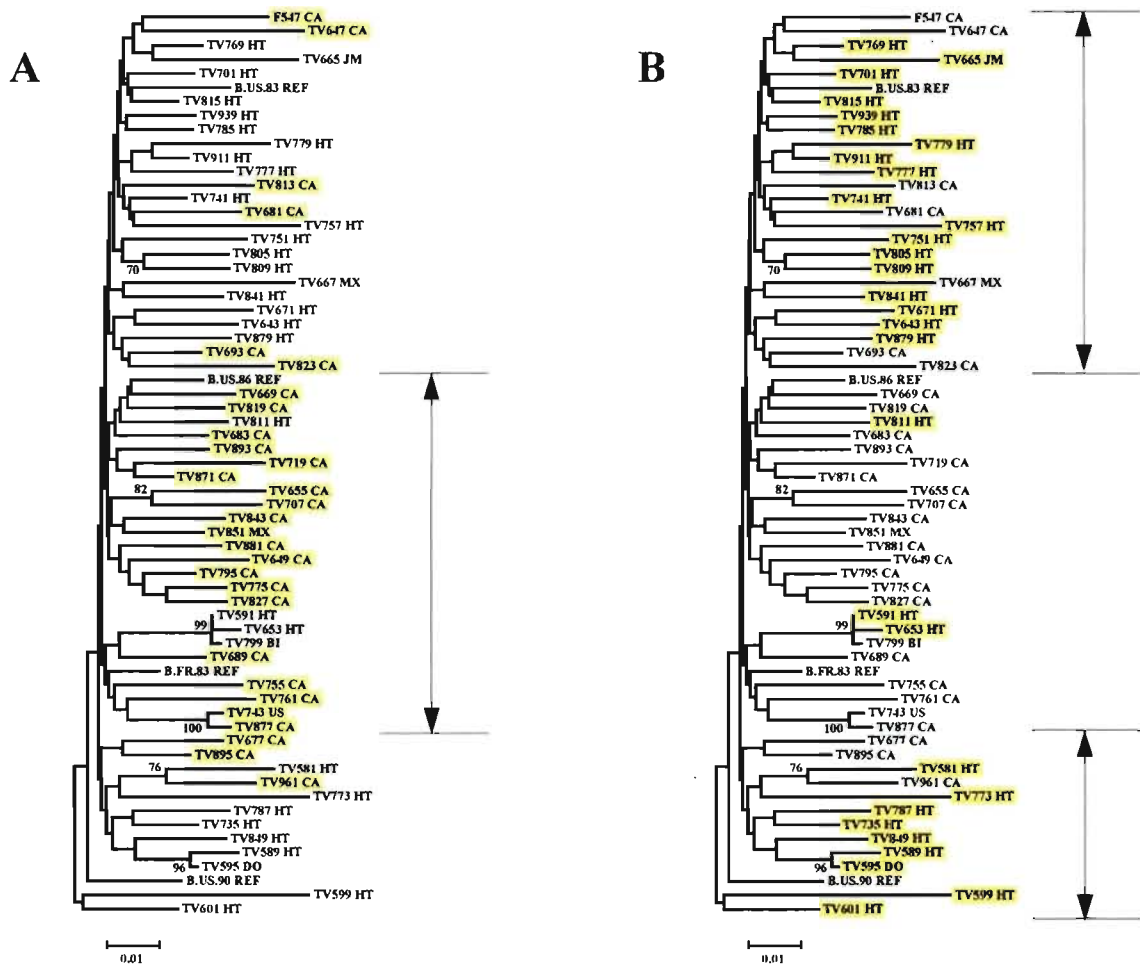


Figure supplémentaire 1. Analyse phylogénétique des Séquences *pol* dérivées des patientes infectées par les virus VIH-1 de sous type B. A. Séquences *pol* des patientes d'Amérique du Nord (Canada et Mexique) et centrale. B. Séquences *pol* des patientes originaires des caraïbes (Haïti, Jamaïque et République Dominicaine).

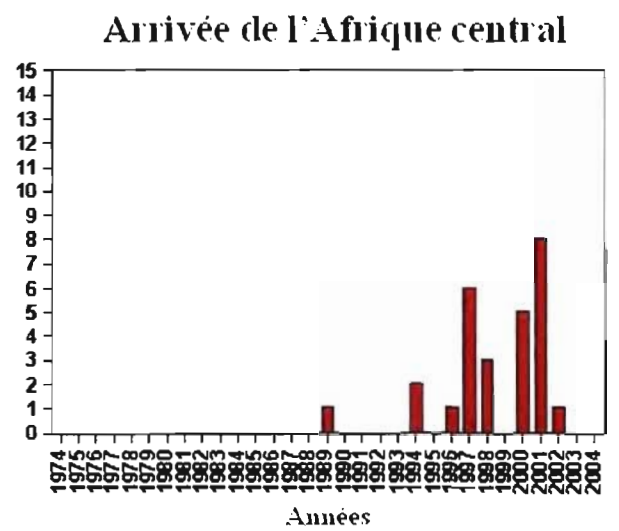
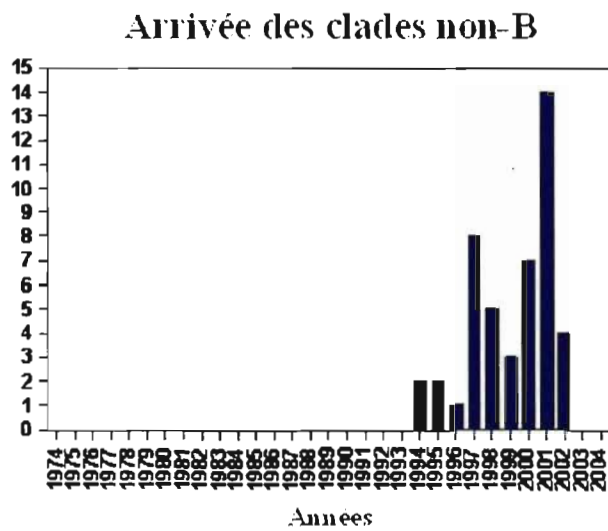


Figure supplémentaire 2. Arrivée des patientes originaire d'Afrique et émergence des virus VIH-1 de sous type non-B.

Article 2

Notre étude sur l'activité des lymphocytes T cytotoxiques VIH-spécifiques au cours de la grossesse est intéressante à plusieurs égards : l'analyse longitudinale a permis de caractériser les fluctuations de l'immunité VIH-spécifique à médiation cellulaire lors du premier, second et troisième trimestre de la grossesse. De plus, l'introduction de la prophylaxie antirétrovirale chez certaines patientes durant la grossesse nous a permis d'évaluer la modulation de cette immunité par la thérapie chez la femme enceinte. Une des particularités de cette étude réside dans le suivi de grossesses consécutives, ce qui nous a permis de mettre en lumière l'évolution des réponses LTC VIH-spécifiques durant la période intergénérisique.

Les données cliniques se rapportant à notre cohorte de femmes enceintes montrent une forte corrélation positive entre le nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Par ailleurs, comme l'avaient décrit Kuhnert et Sabahi, nous n'avons observé aucun changement dans les décomptes CD4 et CD8 au cours de la grossesse (Sabahi et al. 1995; Kuhnert et al. 1998). La thérapie administrée aux femmes durant la grossesse, pour améliorer leur qualité de vie et prévenir la transmission du VIH à l'enfant, a un effet supprimeur sur la charge virale. Ceci explique l'absence de TME chez le groupe de patientes, une charge virale maternelle élevée étant un facteur déterminant de la transmission du VIH à l'enfant (Sperling et al. 1996; Mayaux et al. 1997; Garcia et al. 1999).

La majorité des études sur la fonction des cellules T durant la grossesse ont rapporté une diminution de l'activité des LTC CD8⁺ (Santoli et al. 1976; Gehrz et al. 1981; Kumar et al. 1984; Riley et al. 1989; Watanabe et al. 1997). Notre étude quant à elle établit une corrélation négative entre la fréquence des précurseurs LTC (LTCp) VIH-spécifiques et le nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Compte tenu de la corrélation positive entre le nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ dans notre groupe d'étude, nos résultats indiquent une association entre l'augmentation progressive de la prévalence des réponses LTC VIH-

spécifiques et la progression de la maladie. Nous avons choisi d'utiliser le test de relargage de ^{51}Cr après une expansion des cellules T *in vitro* la fréquence des LTCp a été déterminée par LDA. Cette méthode a été privilégiée dans cette étude parce que les techniques alternatives (dosage ELISpot et marquage intracellulaire) requièrent un grand nombre de cellules pour obtenir une couverture antigénique équivalente. Notre groupe d'études étant constitué de femmes enceintes, il nous était difficile éthiquement parlant d'obtenir le nombre de cellules nécessaires. Les LTCp sont des cellules ayant une capacité intrinsèque de proliférer comme les cellules T CD8^+ mémoires centrales ($\text{CD45RO}^+\text{CCR7}^+$) ou les cellules mémoires effectrices ($\text{CD45RO}^+\text{CCR7}^-$) (Sallusto et al. 2004). Il serait donc nécessaire d'entreprendre des études de phénotypage de ces LTCp VIH-spécifiques par FACS afin de mettre en évidence l'expression des marqueurs CCR7.

Nous avons observé que la fréquence des LTCp VIH-spécifiques des patientes infectées par les virus de clade B était similaire à celle des femmes infectées par les virus de sous-types non-B. Nos données suggèrent qu'une proportion des réponses LTC observées chez les patientes non-B étaient à réactivité croisée conformément à ce qui a été reporté dans d'autres groupes d'études (Cao et al. 1997a; Frahm et al. 2004; Barugahare et al. 2005). Cela, montre clairement que les femmes enceintes sont capables de développer une réponse immunitaire cross-clade à médiation cellulaire. Enfin, nous n'avons noté aucune différence significative entre les moyennes des fréquences de LTCp du premier, second et troisième trimestre de grossesse ou entre les grossesses consécutives dans notre groupe d'étude.

Différentes études ont montré que la thérapie antirétrovirale combinée (HAART) induisait le déclin de l'immunité cellulaire VIH-spécifique chez les patients traités (Gray et al. 1998; Ogg et al. 1999; Pitcher et al. 1999; Soudeyns et al. 2000; Romiti et al. 2001; Trabattoni et al. 2004). Nos résultats démontrent que ce traitement affecte aussi l'immunité cellulaire VIH-spécifique chez les femmes enceintes, ce qui nous permet de conclure que

les LTC circulants ont besoin d'une stimulation antigénique pour se maintenir durant la grossesse.

L'une des particularités de cette étude est d'avoir suivi l'évolution du spectre de reconnaissance antigénique des LTC VIH-spécifiques durant la grossesse. Nous avons trouvé que les plus fortes fréquences de LTC VIH-spécifiques ciblaient préférentiellement les protéines virales Gag, Env, Pol et gp120. À notre grande surprise, les réponses anti-Nef précédemment associées aux mères qui ne transmettent pas le VIH à leurs enfants (Jin et al. 1998), sont moins fréquentes dans notre groupe d'étude. Cette différence peut être attribuable au fait que les femmes de notre groupe d'étude sont en phase chronique d'infection au VIH car l'immunodominance de Nef a été associée au stade primaire de l'infection, alors que Gag, Env et Pol sont plus souvent reconnus dans la phase chronique de l'infection (Lichterfeld et al. 2004). Fait intéressant, les réponses LTC dirigées contre Gag ont été associées à un meilleur contrôle de la charge virale (Patke et al. 2002; Masemola et al. 2004), ce qui suggère que dans le cadre de la TME du VIH, Gag peut constituer un candidat pour le développement de stratégies vaccinales. Nous avons été en mesure de détecter des réponses dirigées contre les protéines accessoires Rev et Tat, ce qui indique que malgré leur petite taille, ces protéines peuvent être ciblées par les LTC durant la grossesse. Enfin, nous avons pu établir une association entre les réponses LTC anti-Gag et de fortes charges virales chez nos patientes. Ceci contraste avec l'association qui a été mise en évidence entre la reconnaissance préférentielle de Gag par les LTC et le contrôle de la réplication virale lors d'infections primaires et chroniques au VIH (Patke et al. 2002; Masemola et al. 2004). L'ensemble de ces données démontre que les femmes enceintes sont capables de développer des réponses LTC VIH anti-VIH multispécifiques. Nous pensons que la divergence entre nos données et les travaux précédents peuvent être le fait de l'environnement hormonal particulier à la grossesse (Wilder 1998; Glinioer 1999). Une hypothèse est que certaines hormones secrétées durant la grossesse seraient immunomodulatrices. Des expériences supplémentaires, incluant l'exploration des réponses LTC VIH-spécifiques avant et après la grossesse, pourraient étayer cette hypothèse.

Une autre particularité de cette étude est d'avoir caractérisé la reconnaissance antigénique des LTC VIH-spécifiques chez des patientes suivies pendant des grossesses consécutives. C'est à notre connaissance la première analyse du genre effectuée chez les femmes infectées par le VIH. Nos résultats montrent des changements plus importants dans la hiérarchie de la reconnaissance d'antigènes VIH entre les grossesses consécutives. Le point fort de cette analyse a été d'établir une corrélation entre l'ampleur de la variation la hiérarchie de la reconnaissance antigénique entre les grossesses consécutives et la durée de l'intervalle intergénérisique. Malgré le nombre limité de patientes, ces résultats suggèrent la présence des forces sélectives qui induisent l'évolution de la reconnaissance antigénique (*i.e.* immunodominance) entre les grossesses. À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui décrit une évolution directionnelle de la reconnaissance antigénique des LTC en fonction du temps dans le contexte d'une infection chronique. Cette évolution peut être perçue à la fois comme étant la manifestation d'un renouvellement de la population des cellules T VIH-spécifiques de spécificités variées (Soudeyins et al. 2000), mais également de l'évolution cyclique des populations virales durant l'intervalle intergénérisique, cette dernière faisant l'objet de l'article 3.

En conclusion, les résultats de cette étude apportent des éléments d'évidence supplémentaires en faveur d'une absence de dysfonctionnement sévère de l'immunité à médiation cellulaire durant la grossesse. Conclusion renforcée par les travaux de Constantin et *al.*, (Constantin et al. 2007). Notre caractérisation longitudinale de la réponse effectrice LTC VIH-spécifique fournit des arguments additionnels en faveur du développement d'une prophylaxie active et/ou de stratégies d'immunisation préventives permettant de renforcer le contrôle de la TME du VIH.

Article 3

Bien que le degré de diversité génétique du gène *env* du VIH ait été associé à la transmission verticale du VIH (Dickover et al. 2001; Arroyo et al. 2002), cette étude est la première à faire une analyse longitudinale de la séquence de *env* au cours de la grossesse et entre les grossesses consécutives. Nos analyses phylogénétiques ont conduit à des constats intéressants. D'abord, une évolution génétique de la région V1-V3 de Env a été mise en évidence durant la grossesse. Malgré la persistance des variants viraux initiaux dans certaines grossesses, nous avons pu mettre en évidence un regroupement net de certaines séquences par trimestre de gestation. Cette stratification a été associée aux grossesses durant lesquelles la charge virale était faible. Il est important de noter le contraste entre nos résultats et ceux publiés en 1995 qui rapportaient la présence d'une population virale hétérogène dans plusieurs échantillons maternels prélevés au cours de la grossesse (Briant et al. 1995). Cette différence peut s'expliquer par le faible nombre de grossesses étudiées dans cette étude (4 au lieu de 19 dans notre cas). Le deuxième constat découle de nos résultats se rapportant aux grossesses consécutives. En effet, nous avons observé un clair regroupement des séquences *env* en fonction de la grossesse chez la majorité de nos patientes. Autrement dit, les populations virales isolées durant la première grossesse étaient différentes de celles qui circulaient lors de la deuxième grossesse. Ceci indique une évolution génétique du virus durant l'intervalle intergénéral. L'ensemble de ces données démontre l'existence d'une dynamique au niveau de la quasiespèce du VIH durant la grossesse et l'intervalle intergénéral, qui pourrait refléter en partie la pression sélective exercée sur le virus par le système immunitaire. Cette hypothèse pourrait être vérifiée dans une étude explorant l'évolution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire dirigée contre Env durant la grossesse et lors de grossesses consécutives, étude qui sera poursuivie dans notre laboratoire (Jolette *et al.*, 2007).

Jusqu'alors, la plupart des études consacrées à la diversité génétique du gène *env* du VIH-1 chez la femme enceinte ont uniquement ciblé la boucle V3 (Briant et al. 1995; Dickover et al. 2001; Arroyo et al. 2002; Barin et al. 2006). Une des particularités de notre étude est d'avoir porté aussi un intérêt à la diversité génétique des régions V1 et V2. Nous avons observé une plus grande diversité génétique dans la région V1, alors que la boucle V3 était la moins diversifiée. Toutefois, nous avons pu établir une corrélation entre le degré de diversification de la région V3 et la durée de la période intergénéralique. Ces résultats renforcent ceux publiés par Lamers et al., qui ont rapporté de plus fortes distances génétiques dans la boucle V1 (Lamers et al. 1993), et indiquent que l'évolution génétique de la population virale entre les grossesses consécutives est liée à la diversification du domaine V3. Des études supplémentaires seront requises afin de déterminer l'impact de cette évolution sur le tropisme cellulaire de ces virus. Par ailleurs, la thérapie antirétrovirale semble augmenter la complexité génétique de toutes les régions de Env que nous avons examinées. Nous pensons que c'est en restaurant ou maintenant les compétences immunitaires qui exercent une pression sélective sur le virus que la thérapie induit ou favorise cette diversification.

Nos données concernant l'évolution de la diversification des populations virales durant la grossesse montrent une régression de la complexité génétique au troisième trimestre dans toutes les régions investiguées. La thérapie antirétrovirale semble augmenter le degré de diversité durant toute la grossesse, un effet qui est plus notable au troisième trimestre. En plus de la reconstitution du système immunitaire et de la diminution de la charge virale, cela pourrait être un autre moyen par lequel la thérapie prévient la transmission mère-enfant du VIH. En effet, une faible diversité génétique de *env* a été associée à un risque élevé de transmission mère-enfant du VIH-1 (Dickover et al. 2001; Arroyo et al. 2002). Nous postulons qu'en augmentant cette diversité au troisième trimestre, la prophylaxie antirétrovirale diminue le risque de transmission du VIH durant le travail ou l'accouchement. Il faut rappeler que la transmission *intra partum* est à l'origine

de près de 50% des cas d'infection chez les enfants (Bryson et al. 1992). Il serait intéressant de réaliser une étude sur un nombre plus élevé de patientes pour confirmer ce postulat. Il est important de souligner l'hétérogénéité du nombre d'échantillons analysés lors de chaque trimestre de grossesse dans l'étude de l'impact de la thérapie antirétrovirale. Fort est de constater que ce nombre augmente considérablement au troisième trimestre. Cela est dû à la variabilité du moment de l'initiation de la thérapie durant la grossesse. La thérapie n'étant souvent introduite qu'à partir du deuxième trimestre, il est normal que nous ayons obtenu plus d'échantillons au troisième trimestre.

L'étude des ratios dN/dS est intéressante à bien des égards, d'abord parce qu'elles nous montrent que la région V1 semble ne pas être soumise à une pression sélective, ce qui indique que des mutations spontanées sont à l'origine de l'importante diversité génétique observée dans cette région. Ensuite, parce qu'elle indique que la boucle V2 pourrait être plus ciblée par le système immunitaire que V3. La contribution de l'immunité à la diversification de V2 est renforcée par la forte corrélation négative que l'on observe entre le décompte CD4 et le ratio dN/dS dans cette région. Ceci souligne l'importance d'inclure la boucle V2 dans les études portant sur la diversité génétique du VIH et l'impact de l'immunité sur cette diversité.

Enfin, cette étude a permis de mettre en évidence l'évolution génétique de la population virale durant la grossesse et entre les grossesses consécutives. Elle souligne l'importance d'inclure l'analyse de la région V2 de Env dans toutes les études consacrées à la diversité génétique du gène *env* du VIH-1. Enfin, elle propose pour la première fois un autre moyen par lequel la prophylaxie antirétrovirale diminue l'incidence de la TME du VIH. Nous émettons l'hypothèse qu'en restaurant les compétences immunitaires, la thérapie augmente la diversité génétique durant la grossesse ce qui, contribue en partie à la réduction du risque de transmission.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a montré un caractère exceptionnel à bien des égards. L'objectif principal de cette étude a été de caractériser à la fois l'immunité cellulaire anti-VIH et les populations virales VIH chez la femme enceinte. Ce qui, constitue une avancée importante dans la recherche sur la transmission mère-enfant du VIH.

Nous avons montré que de multiples clades du VIH-1 sont entrain d'être introduits dans un grand centre urbain d'Amérique du Nord suite à l'influx de nouveaux arrivants d'origine africaine. Ceci, nous permet de conclure que les cohortes prénatales peuvent constituer d'importants sites sentinelles pour le suivi de l'introduction et de l'évolution des nouveaux variants viraux dans les pays industrialisés.

Nous avons démontré que les femmes enceintes sont capables de monter une immunité à médiation cellulaire robuste, vigoureuse, multispécifique et à réactivité croisée contre le VIH. Une découverte qui soutient la théorie d'une absence de dysfonctionnement sévère de l'immunité cellulaire durant la grossesse.

Nous avons également mis en évidence l'existence d'une dynamique au niveau des quasiespèces VIH durant la grossesse et l'intervalle intergénérisique. Les populations virales, qui varient au cours de la grossesse et entre les grossesses consécutives, sont plus homogènes en fin de grossesse. La thérapie antirétrovirale augmente la diversité virale, ce qui nous a permis de proposer un mécanisme supplémentaire par lequel la prophylaxie antirétrovirale réduit l'incidence de la transmission mère-enfant du VIH.

Cette étude apporte des éléments scientifiques importants pour le développement de nouvelles stratégies qui permettront de renforcer le contrôle de la transmission mère-enfant du VIH.

Bibliographie

- Abebe, A., Demissie, D., Goudsmit, J., Brouwer, M., Kuiken, C. L., Pollakis, G., Schuitemaker, H., Fontanet, A. L., and Rinke de Wit, T. F.: HIV-1 subtype C syncytium- and non-syncytium-inducing phenotypes and coreceptor usage among Ethiopian patients with AIDS. *AIDS (London, England)* 13: 1305-11, 1999
- Addo, M. M., Yu, X. G., Rathod, A., Cohen, D., Eldridge, R. L., Strick, D., Johnston, M. N., Corcoran, C., Wurcel, A. G., Fitzpatrick, C. A., Feeney, M. E., Rodriguez, W. R., Basgoz, N., Draenert, R., Stone, D. R., Brander, C., Goulder, P. J., Rosenberg, E. S., Altfeld, M., and Walker, B. D.: Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *Journal of virology* 77: 2081-92, 2003
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E., and Trono, D.: Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76: 853-64, 1994
- Akouamba, B. S., Viel, J., Charest, H., Merindol, N., Samson, J., Lapointe, N., Brenner, B. G., Lalonde, R., Harrigan, P. R., Boucher, M., and Soudeyns, H.: HIV-1 genetic diversity in antenatal cohort, Canada. *Emerging infectious diseases* 11: 1230-4, 2005
- Alaeus, A., Leitner, T., Lidman, K., and Albert, J.: Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden. *AIDS (London, England)* 11: 199-202, 1997
- Al-Harhi, L., Guilbert, L. J., Hoxie, J. A., and Landay, A.: Trophoblasts are productively infected by CD4-independent isolate of HIV type 1. *AIDS research and human retroviruses* 18: 13-7, 2002
- Alimenti, A., Burdge, D. R., Ogilvie, G. S., Money, D. M., and Forbes, J. C.: Lactic acidemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants exposed to perinatal antiretroviral therapy. *The Pediatric infectious disease journal* 22: 782-9, 2003
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A.: CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-8, 1996
- Alkhatib, G., Liao, F., Berger, E. A., Farber, J. M., and Peden, K. W.: A new SIV co-receptor, STRL33. *Nature* 388: 238, 1997
- Allen, T. M., O'Connor, D. H., Jing, P., Dzuris, J. L., Mothe, B. R., Vogel, T. U., Dunphy, E., Liebl, M. E., Emerson, C., Wilson, N., Kunstman, K. J., Wang, X., Allison, D. B., Hughes, A. L., Desrosiers, R. C., Altman, J. D., Wolinsky, S. M., Sette, A., and Watkins, D. I.: Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 407: 386-90, 2000
- Al-Shammri, S., Rawoot, P., Azizieh, F., AbuQoora, A., Hanna, M., Saminathan, T. R., and Raghupathy, R.: Th1/Th2 cytokine patterns and clinical profiles during and after pregnancy in women with multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 222: 21-7, 2004
- Altfeld, M., Addo, M. M., Rosenberg, E. S., Hecht, F. M., Lee, P. K., Vogel, M., Yu, X. G., Draenert, R., Johnston, M. N., Strick, D., Allen, T. M., Feeney, M. E., Kahn, J. O., Sekaly, R. P., Levy, J. A., Rockstroh, J. K., Goulder, P. J., and Walker, B. D.: Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS (London, England)* 17: 2581-91, 2003

- Altfeld, M., Allen, T. M., Yu, X. G., Johnston, M. N., Agrawal, D., Korber, B. T., Montefiori, D. C., O'Connor, D. H., Davis, B. T., Lee, P. K., Maier, E. L., Harlow, J., Goulder, P. J., Brander, C., Rosenberg, E. S., and Walker, B. D.: HIV-1 superinfection despite broad CD8⁺ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature* 420: 434-9, 2002
- Amara, R. R., Villinger, F., Altman, J. D., Lydy, S. L., O'Neil, S. P., Staprans, S. I., Montefiori, D. C., Xu, Y., Herndon, J. G., Wyatt, L. S., Candido, M. A., Kozyr, N. L., Earl, P. L., Smith, J. M., Ma, H. L., Grimm, B. D., Hulsey, M. L., Miller, J., McClure, H. M., McNicholl, J. M., Moss, B., and Robinson, H. L.: Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292: 69-74, 2001
- An, L. L., Rodriguez, F., Harkins, S., Zhang, J., and Whitton, J. L.: Quantitative and qualitative analyses of the immune responses induced by a multivalent minigene DNA vaccine. *Vaccine* 18: 2132-41, 2000
- Anderson, J. E.: The frequency of anonymous HIV testing in the United States: data from a national survey. *AIDS (London, England)* 13: 1595-7, 1999
- Appay, V., Nixon, D. F., Donahoe, S. M., Gillespie, G. M., Dong, T., King, A., Ogg, G. S., Spiegel, H. M., Conlon, C., Spina, C. A., Havlir, D. V., Richman, D. D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A. J., and Rowland-Jones, S. L.: HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *The Journal of experimental medicine* 192: 63-75, 2000
- Arias, R. A., Munoz, L. D., and Munoz-Fernandez, M. A.: Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* 307: 266-77, 2003
- Arroyo, M. A., Tien, H., Pagan, M., Swanstrom, R., Hillyer, G. V., Cadilla, C. L., and Melendez-Guerrero, L. M.: Virologic risk factors for vertical transmission of HIV type 1 in Puerto Rico. *AIDS research and human retroviruses* 18: 447-60, 2002
- Atkinson, K., Dodds, A. J., Concannon, A. J., and Biggs, J. C.: The development of the acquired immunodeficiency syndrome after bone-marrow transplantation. *The Medical journal of Australia* 147: 510-2, 1987
- Baba, T. W., Koch, J., Mittler, E. S., Greene, M., Wyand, M., Penninck, D., and Ruprecht, R. M.: Mucosal infection of neonatal rhesus monkeys with cell-free SIV. *AIDS research and human retroviruses* 10: 351-7, 1994
- Baba, T. W., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, W., Ayehunie, S., Cavacini, L. A., Posner, M. R., Katinger, H., Stiegler, G., Bernacky, B. J., Rizvi, T. A., Schmidt, R., Hill, L. R., Keeling, M. E., Lu, Y., Wright, J. E., Chou, T. C., and Ruprecht, R. M.: Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nature medicine* 6: 200-6, 2000
- Badri, M., Cleary, S., Maartens, G., Pitt, J., Bekker, L. G., Orrell, C., and Wood, R.: When to initiate highly active antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa? A South African cost-effectiveness study. *Antiviral therapy* 11: 63-72, 2006

- Bagarazzi, M. L., Boyer, J. D., Javadian, M. A., Chattergoon, M. A., Shah, A. R., Cohen, A. D., Bennett, M. K., Ciccarelli, R. B., Ugen, K. E., and Weiner, D. B.: Systemic and mucosal immunity is elicited after both intramuscular and intravaginal delivery of human immunodeficiency virus type 1 DNA plasmid vaccines to pregnant chimpanzees. *The Journal of infectious diseases* 180: 1351-5, 1999
- Bahr, G. M., Capron, A., Dewulf, J., Nagata, S., Tanaka, M., Bourez, J. M., and Mouton, Y.: Elevated serum level of Fas ligand correlates with the asymptomatic stage of human immunodeficiency virus infection. *Blood* 90: 896-8, 1997
- Barin, F., Jourdain, G., Brunet, S., Ngo-Giang-Huong, N., Weerawatgoompa, S., Karnchanamayul, W., Ariyadej, S., Hansudewechakul, R., Achalapong, J., Yuthavisuthi, P., Ngampiyaskul, C., Bhakeecheep, S., Hemwutthiphon, C., and Lallemand, M.: Revisiting the role of neutralizing antibodies in mother-to-child transmission of HIV-1. *The Journal of infectious diseases* 193: 1504-11, 2006
- Barouch, D. H., Kunstman, J., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Santra, S., Peyerl, F. W., Krivulka, G. R., Beaudry, K., Lifton, M. A., Gorgone, D. A., Montefiori, D. C., Lewis, M. G., Wolinsky, S. M., and Letvin, N. L.: Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 415: 335-9, 2002
- Barouch, D. H., Santra, S., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Plishka, R., Buckler-White, A., Gaitan, A. E., Zin, R., Nam, J. H., Wyatt, L. S., Lifton, M. A., Nickerson, C. E., Moss, B., Montefiori, D. C., Hirsch, V. M., and Letvin, N. L.: Reduction of simian-human immunodeficiency virus 89.6P viremia in rhesus monkeys by recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccination. *Journal of virology* 75: 5151-8, 2001
- Barouch, D. H., Santra, S., Schmitz, J. E., Kuroda, M. J., Fu, T. M., Wagner, W., Bilaska, M., Craiu, A., Zheng, X. X., Krivulka, G. R., Beaudry, K., Lifton, M. A., Nickerson, C. E., Trigona, W. L., Punt, K., Freed, D. C., Guan, L., Dubey, S., Casimiro, D., Simon, A., Davies, M. E., Chastain, M., Strom, T. B., Gelman, R. S., Montefiori, D. C., Lewis, M. G., Emini, E. A., Shiver, J. W., and Letvin, N. L.: Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* 290: 486-92, 2000
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L.: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-71, 1983
- Barret, B., Tardieu, M., Rustin, P., Lacroix, C., Chabrol, B., Desguerre, I., Dollfus, C., Mayaux, M. J., and Blanche, S.: Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-1-exposed but uninfected infants: clinical screening in a large prospective cohort. *AIDS (London, England)* 17: 1769-85, 2003
- Barroga, C. F., Raskino, C., Fangon, M. C., Palumbo, P. E., Baker, C. J., Englund, J. A., and Spector, S. A.: The CCR5Delta32 allele slows disease progression of human immunodeficiency virus-1-infected children receiving antiretroviral treatment. *The Journal of infectious diseases* 182: 413-9, 2000

- Barugahare, B., Baker, C., K'Aluoch, O., Donovan, R., Elrefaei, M., Eggena, M., Jones, N., Mutalya, S., Kityo, C., Mugenyi, P., and Cao, H.: Human immunodeficiency virus-specific responses in adult Ugandans: patterns of cross-clade recognition. *Journal of virology* 79: 4132-9, 2005
- Behbahani, H., Popek, E., Garcia, P., Andersson, J., Spetz, A. L., Landay, A., Flener, Z., and Patterson, B. K.: Up-regulation of CCR5 expression in the placenta is associated with human immunodeficiency virus-1 vertical transmission. *The American journal of pathology* 157: 1811-8, 2000
- Belda, F. J., Barlow, K. L., Murphy, G., Parry, J. V., and Clewley, J. P.: A dual subtype B/E HIV type 1 infection with a novel V3 loop crown motif among infections acquired in Thailand and imported into England. *AIDS research and human retroviruses* 14: 911-6, 1998
- Berke, G.: The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annual review of immunology* 12: 735-73, 1994
- Bertolli, J., St Louis, M. E., Simonds, R. J., Nieburg, P., Kamenga, M., Brown, C., Tarande, M., Quinn, T., and Ou, C. Y.: Estimating the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in a breast-feeding population in Kinshasa, Zaire. *The Journal of infectious diseases* 174: 722-6, 1996
- Bhooapat, L., Khunamornpong, S., Sirivatanapa, P., Rithaporn, T., Lerdsrimongkol, P., Thorner, P. S., and Bhooapat, T.: Chorioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period. *Modern pathology* 18: 1357-64, 2005
- Biggar, R. J., Miotti, P. G., Taha, T. E., Mtimavalye, L., Broadhead, R., Justesen, A., Yellin, F., Liomba, G., Miley, W., Waters, D., Chipangwi, J. D., and Goedert, J. J.: Perinatal intervention trial in Africa: effect of a birth canal cleansing intervention to prevent HIV transmission. *Lancet* 347: 1647-50, 1996
- Birk, M. and Sonnerborg, A.: Variations in HIV-1 pol gene associated with reduced sensitivity to antiretroviral drugs in treatment-naïve patients. *AIDS (London, England)* 12: 2369-75, 1998
- Blackard, J. T., Cohen, D. E., and Mayer, K. H.: Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clinical infectious diseases* 34: 1108-14, 2002
- Blackard, J. T., Renjifo, B., Fawzi, W., Hertzmark, E., Msamanga, G., Mwakagile, D., Hunter, D., Spiegelman, D., Sharghi, N., Kagoma, C., and Essex, M.: HIV-1 LTR subtype and perinatal transmission. *Virology* 287: 261-5, 2001
- Blanche, S., Tardieu, M., Rustin, P., Slama, A., Barret, B., Firtion, G., Ciraru-Vigneron, N., Lacroix, C., Rouzioux, C., Mandelbrot, L., Desguerre, I., Rotig, A., Mayaux, M. J., and Delfraissy, J. F.: Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet* 354: 1084-9, 1999
- Bobbitt, K. R., Addo, M. M., Altfeld, M., Filzen, T., Onafuwa, A. A., Walker, B. D., and Collins, K. L.: Rev activity determines sensitivity of HIV-1-infected primary T cells to CTL killing. *Immunity* 18: 289-99, 2003

- Boni, J., Pyra, H., Gebhardt, M., Perrin, L., Burgisser, P., Matter, L., Fierz, W., Erb, P., Piffaretti, J. C., Minder, E., Grob, P., Burckhardt, J. J., Zwahlen, M., and Schupbach, J.: High frequency of non-B subtypes in newly diagnosed HIV-1 infections in Switzerland. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (1999) 22: 174-9, 1999
- Bonneux, L., Van der Stuyft, P., Taelman, H., Cornet, P., Goilav, C., van der Groen, G., and Piot, P.: Risk factors for infection with human immunodeficiency virus among European expatriates in Africa. *BMJ (Clinical research ed)* 297: 581-4, 1988
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Oldstone, M. B.: Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 68: 6103-10, 1994
- Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Pfeffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., Gairin, J. E., Hahn, B. H., Oldstone, M. B., and Shaw, G. M.: Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature medicine* 3: 205-11, 1997
- Brandt, C. D., Sison, A. V., Rakusan, T. A., Kaufman, T. E., Saxena, E. S., O'Donnell, R. M., Ellaurie, M., and Sever, J. L.: HIV DNA blood levels in vertically infected pediatric patients: variations with age, association with disease progression, and comparison with blood levels in infected mothers. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* 13: 254-61, 1996
- Brenner, B. G., Routy, J. P., Petrella, M., Moisi, D., Oliveira, M., Detorio, M., Spira, B., Essabag, V., Conway, B., Lalonde, R., Sekaly, R. P., and Wainberg, M. A.: Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *Journal of virology* 76: 1753-61, 2002
- Briant, L., Wade, C. M., Puel, J., Brown, A. J., and Guyader, M.: Analysis of envelope sequence variants suggests multiple mechanisms of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 69: 3778-88, 1995
- Brinkman, K., ter Hofstede, H. J., Burger, D. M., Smeitink, J. A., and Koopmans, P. P.: Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS (London, England)* 12: 1735-44, 1998
- Brodie, S. J., Lewinsohn, D. A., Patterson, B. K., Jiyamapa, D., Krieger, J., Corey, L., Greenberg, P. D., and Riddell, S. R.: In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nature medicine* 5: 34-41, 1999
- Brodine, S. K., Shaffer, R. A., Starkey, M. J., Tasker, S. A., Gilcrest, J. L., Louder, M. K., Barile, A., VanCott, T. C., Vahey, M. T., McCutchan, F. E., Birx, D. L., Richman, D. D., and Mascola, J. R.: Drug resistance patterns, genetic subtypes, clinical features, and risk factors in military personnel with HIV-1 seroconversion. *Annals of internal medicine* 131: 502-6, 1999
- Brodine, S. K., Starkey, M. J., Shaffer, R. A., Ito, S. I., Tasker, S. A., Barile, A. J., Tamminga, C. L., Stephan, K. T., Aronson, N. E., Fraser, S. L., Wallace, M. R.,

- Wegner, S. A., Mascola, J. R., and McCutchan, F. E.: Diverse HIV-1 subtypes and clinical, laboratory and behavioral factors in a recently infected US military cohort. *AIDS (London, England)* 17: 2521-7, 2003
- Brossard, Y., Aubin, J. T., Mandelbrot, L., Bignozzi, C., Brand, D., Chaput, A., Roume, J., Mulliez, N., Mallet, F., Agut, H., and et al.: Frequency of early in utero HIV-1 infection: a blind DNA polymerase chain reaction study on 100 fetal thymuses. *AIDS (London, England)* 9: 359-66, 1995
- Bryson, Y. J.: Perinatal HIV-1 transmission: recent advances and therapeutic interventions. *AIDS (London, England)* 10 Suppl 3: S33-42, 1996
- Bryson, Y. J., Luzuriaga, K., Sullivan, J. L., and Wara, D. W.: Proposed definitions for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1. *The New England journal of medicine* 327: 1246-7, 1992
- Bulterys, M., Chao, A., Dushimimana, A., Habimana, P., Nawrocki, P., Kurawige, J. B., Musanganire, F., and Saah, A.: Multiple sexual partners and mother-to-child transmission of HIV-1. *AIDS (London, England)* 7: 1639-45, 1993
- Bulterys, M., Chao, A., Dushimimana, A., Kageruka, M., Nawrocki, P., and Saah, A. J.: HIV-exposed twins. *Lancet* 339: 628, 1992
- Bulterys, M., Landesman, S., Burns, D. N., Rubinstein, A., and Goedert, J. J.: Sexual behavior and injection drug use during pregnancy and vertical transmission of HIV-1. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* 15: 76-82, 1997
- Bures, R., Morris, L., Williamson, C., Ramjee, G., Deers, M., Fiscus, S. A., Abdool-Karim, S., and Montefiori, D. C.: Regional clustering of shared neutralization determinants on primary isolates of clade C human immunodeficiency virus type 1 from South Africa. *Journal of virology* 76: 2233-44, 2002
- Burns, D. N., Landesman, S., Muenz, L. R., Nugent, R. P., Goedert, J. J., Minkoff, H., Walsh, J. H., Mendez, H., Rubinstein, A., and Willoughby, A.: Cigarette smoking, premature rupture of membranes, and vertical transmission of HIV-1 among women with low CD4+ levels. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 7: 718-26, 1994
- Bushman, F. D., Fujiwara, T., and Craigie, R.: Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 249: 1555-8, 1990
- Buve, A., Bishikwabo-Nsarhaza, K., and Mutangadura, G.: The spread and effect of HIV-1 infection in sub-Saharan Africa. *Lancet* 359: 2011-7, 2002
- Bwayo, J., Plummer, F., Omari, M., Mutere, A., Moses, S., Ndinya-Achola, J., Velentgas, P., and Kreiss, J.: Human immunodeficiency virus infection in long-distance truck drivers in east Africa. *Archives of internal medicine* 154: 1391-6, 1994
- Cantin, R., Fortin, J. F., Lamontagne, G., and Tremblay, M.: The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *Journal of virology* 71: 1922-30, 1997
- Cao, H., Kanki, P., Sankale, J. L., Dieng-Sarr, A., Mazzara, G. P., Kalams, S. A., Korber, B., Mboup, S., and Walker, B. D.: Cytotoxic T-lymphocyte cross-reactivity among

- different human immunodeficiency virus type 1 clades: implications for vaccine development. *Journal of virology* 71: 8615-23, 1997a
- Cao, H., Mani, I., Vincent, R., Mugerwa, R., Mugenyi, P., Kanki, P., Ellner, J., and Walker, B. D.: Cellular immunity to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) clades: relevance to HIV-1 vaccine trials in Uganda. *The Journal of infectious diseases* 182: 1350-6, 2000
- Cao, Y., Krogstad, P., Korber, B. T., Koup, R. A., Muldoon, M., Macken, C., Song, J. L., Jin, Z., Zhao, J. Q., Clapp, S., Chen, I. S., Ho, D. D., and Ammann, A. J.: Maternal HIV-1 viral load and vertical transmission of infection: the Ariel Project for the prevention of HIV transmission from mother to infant. *Nature medicine* 3: 549-52, 1997b
- Caride, E., Hertogs, K., Larder, B., Dehertogh, P., Brindeiro, R., Machado, E., de Sa, C. A., Eyer-Silva, W. A., Sion, F. S., Passioni, L. F., Menezes, J. A., Calazans, A. R., and Tanuri, A.: Genotypic and phenotypic evidence of different drug-resistance mutation patterns between B and non-B subtype isolates of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virus genes* 23: 193-202, 2001
- Carl, S., Greenough, T. C., Krumbiegel, M., Greenberg, M., Skowronski, J., Sullivan, J. L., and Kirchhoff, F.: Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *Journal of virology* 75: 3657-65, 2001
- Carrington, M., Nelson, G. W., Martin, M. P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J. J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K., and O'Brien, S. J.: HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283: 1748-52, 1999
- Casper, C. H., Clevestig, P., Carlenor, E., Leitner, T., Anzen, B., Lidman, K., Belfrage, E., Albert, J., Bohlin, A. B., Naver, L., Lindgren, S., Fenyo, E. M., and Ehrnst, A. C.: Link between the X4 phenotype in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers and their children, despite the early presence of R5 in the child. *The Journal of infectious diseases* 186: 914-21, 2002
- Chaix, M. L., Descamps, D., Harzic, M., Schneider, V., Deveau, C., Tamalet, C., Pellegrin, I., Izopet, J., Ruffault, A., Masquelier, B., Meyer, L., Rouzioux, C., Brun-Vezinet, F., and Costagliola, D.: Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *AIDS (London, England)* 17: 2635-43, 2003
- Champagne, P., Ogg, G. S., King, A. S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G. P., Fleury, S., Lipp, M., Forster, R., Rowland-Jones, S., Sekaly, R. P., McMichael, A. J., and Pantaleo, G.: Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410: 106-11, 2001
- Chan, D. C. and Kim, P. S.: HIV entry and its inhibition. *Cell* 93: 681-4, 1998
- Chan, W. L., Rodgers, A., Grief, C., Almond, N., Ellis, S., Flanagan, B., Silvera, P., Bootman, J., Stott, J., Kent, K., and et al.: Immunization with class I human

- histocompatibility leukocyte antigen can protect macaques against challenge infection with SIVmac-32H. *AIDS (London, England)* 9: 223-8, 1995
- Chan, W. L., Rodgers, A., Hancock, R. D., Taffs, F., Kitchin, P., Farrar, G., and Liew, F. Y.: Protection in simian immunodeficiency virus-vaccinated monkeys correlates with anti-HLA class I antibody response. *The Journal of experimental medicine* 176: 1203-7, 1992
- Charpentier, C., Nora, T., Tenailon, O., Clavel, F., and Hance, A. J.: Extensive recombination among human immunodeficiency virus type 1 quasispecies makes an important contribution to viral diversity in individual patients. *Journal of virology* 80: 2472-82, 2006
- Chen, Z., Huang, Y., Zhao, X., Skulsky, E., Lin, D., Ip, J., Gettie, A., and Ho, D. D.: Enhanced infectivity of an R5-tropic simian/human immunodeficiency virus carrying human immunodeficiency virus type 1 subtype C envelope after serial passages in pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*). *Journal of virology* 74: 6501-10, 2000
- Cheyrier, R., Langlade-Demoyen, P., Marescot, M. R., Blanche, S., Blondin, G., Wain-Hobson, S., Griscelli, C., Vilmer, E., and Plata, F.: Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *European journal of immunology* 22: 2211-7, 1992
- Cho, M. W., Lee, M. K., Carney, M. C., Berson, J. F., Doms, R. W., and Martin, M. A.: Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *Journal of virology* 72: 2509-15, 1998
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J.: The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85: 1135-48, 1996
- Clemetson, D. B., Moss, G. B., Willerford, D. M., Hensel, M., Emonyi, W., Holmes, K. K., Plummer, F., Ndinya-Achola, J., Roberts, P. L., Hillier, S., and et al.: Detection of HIV DNA in cervical and vaginal secretions. Prevalence and correlates among women in Nairobi, Kenya. *Jama* 269: 2860-4, 1993
- Clerici, M., Lucey, D. R., Zajac, R. A., Boswell, R. N., Gebel, H. M., Takahashi, H., Berzofsky, J. A., and Shearer, G. M.: Detection of cytotoxic T lymphocytes specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individuals. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 146: 2214-9, 1991
- Clumeck, N., Sonnet, J., Taelman, H., Cran, S., and Henrivaux, P.: Acquired immune deficiency syndrome in Belgium and its relation to Central Africa. *Annals of the New York Academy of Sciences* 437: 264-9, 1984
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., and et al.: Human immunodeficiency viruses. *Science* 232: 697, 1986

- Cohen, G. B., Gandhi, R. T., Davis, D. M., Mandelboim, O., Chen, B. K., Strominger, J. L., and Baltimore, D.: The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10: 661-71, 1999
- Colgrove, R. C., Pitt, J., Chung, P. H., Welles, S. L., and Japour, A. J.: Selective vertical transmission of HIV-1 antiretroviral resistance mutations. *AIDS (London, England)* 12: 2281-8, 1998
- Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., and Baltimore, D.: HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391: 397-401, 1998
- Combadiere, C., Salzwedel, K., Smith, E. D., Tiffany, H. L., Berger, E. A., and Murphy, P. M.: Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *The Journal of biological chemistry* 273: 23799-804, 1998
- Connor, E. M., Sperling, R. S., Gelber, R., Kiselev, P., Scott, G., O'Sullivan, M. J., VanDyke, R., Bey, M., Shearer, W., Jacobson, R. L., and et al.: Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *The New England journal of medicine* 331: 1173-80, 1994
- Constantin, C. M., Masopust, D., Gourley, T., Grayson, J., Strickland, O. L., Ahmed, R., and Bonney, E. A.: Normal establishment of virus-specific memory CD8 T cell pool following primary infection during pregnancy. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 179: 4383-9, 2007
- Cornelissen, M., Mulder-Kampinga, G., Veenstra, J., Zorgdrager, F., Kuiken, C., Hartman, S., Dekker, J., van der Hoek, L., Sol, C., Coutinho, R., and et al.: Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. *Journal of virology* 69: 1810-8, 1995
- Coutsoudis, A., Pillay, K., Spooner, E., Kuhn, L., and Coovadia, H. M.: Randomized trial testing the effect of vitamin A supplementation on pregnancy outcomes and early mother-to-child HIV-1 transmission in Durban, South Africa. South African Vitamin A Study Group. *AIDS (London, England)* 13: 1517-24, 1999
- Couturier, E., Damond, F., Roques, P., Fleury, H., Barin, F., Brunet, J. B., Brun-Vezinet, F., and Simon, F.: HIV-1 diversity in France, 1996-1998. The AC 11 laboratory network. *AIDS (London, England)* 14: 289-96, 2000
- Cressey, T. R., Jourdain, G., Lallemand, M. J., Kunkeaw, S., Jackson, J. B., Musoke, P., Capparelli, E., and Mirochnick, M.: Persistence of nevirapine exposure during the postpartum period after intrapartum single-dose nevirapine in addition to zidovudine prophylaxis for the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 38: 283-8, 2005
- Cu-Uvin, S., Snyder, B., Harwell, J. I., Hogan, J., Chibwasha, C., Hanley, D., Ingersoll, J., Kurpewski, J., Mayer, K. H., and Caliendo, A. M.: Association between paired

- plasma and cervicovaginal lavage fluid HIV-1 RNA levels during 36 months. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 42: 584-7, 2006
- Da Silva, J. A. and Spector, T. D.: The role of pregnancy in the course and aetiology of rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology* 11: 189-94, 1992
- Dabis, F., Leroy, V., Castetbon, K., Spira, R., Newell, M. L., and Salamon, R.: Preventing mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa in the year 2000. *AIDS (London, England)* 14: 1017-26, 2000
- Dagleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., and Weiss, R. A.: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-7, 1984
- David, F. J., Tran, H. C., Serpente, N., Autran, B., Vaquero, C., Djian, V., Menu, E., Barre-Sinoussi, F., and Chaouat, G.: HIV infection of choriocarcinoma cell lines derived from human placenta: the role of membrane CD4 and Fc-Rs into HIV entry. *Virology* 208: 784-8, 1995
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E. J., Coovadia, H. M., Goulder, P. J., Klenerman, P., Ahmed, R., Freeman, G. J., and Walker, B. D.: PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443: 350-4, 2006
- De Maria, A., Cirillo, C., and Moretta, L.: Occurrence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T cell activity in apparently uninfected children born to HIV-1-infected mothers. *The Journal of infectious diseases* 170: 1296-9, 1994
- De Rossi, A., Masiero, S., Giaquinto, C., Ruga, E., Comar, M., Giacca, M., and Chieco-Bianchi, L.: Dynamics of viral replication in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of clinical investigation* 97: 323-30, 1996
- Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V. A., Crowe, S., Maerz, A., Sonza, S., Learmont, J., Sullivan, J. S., Cunningham, A., Dwyer, D., Dowton, D., and Mills, J.: Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270: 988-91, 1995
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., and O'Brien, S. J.: 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* 273: 1856-62, 1996

- Deeks, S. G.: International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 26 Suppl 1: S25-33, 2001
- Delwart, E. L., Orton, S., Parekh, B., Dobbs, T., Clark, K., and Busch, M. P.: Two percent of HIV-positive U.S. blood donors are infected with non-subtype B strains. *AIDS research and human retroviruses* 19: 1065-70, 2003
- Descamps, D., Apetrei, C., Collin, G., Damond, F., Simón, F., and Brun-Vezinet, F.: Naturally occurring decreased susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors. *AIDS (London, England)* 12: 1109-11, 1998
- Devash, Y., Calvelli, T. A., Wood, D. G., Reagan, K. J., and Rubinstein, A.: Vertical transmission of human immunodeficiency virus is correlated with the absence of high-affinity/avidity maternal antibodies to the gp120 principal neutralizing domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 3445-9, 1990
- Dickover, R., Garratty, E., Yusim, K., Miller, C., Korber, B., and Bryson, Y.: Role of maternal autologous neutralizing antibody in selective perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 escape variants. *Journal of virology* 80: 6525-33, 2006
- Dickover, R. E., Garratty, E. M., Plaeger, S., and Bryson, Y. J.: Perinatal transmission of major, minor, and multiple maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in utero and intrapartum. *Journal of virology* 75: 2194-203, 2001
- Dietrich, U., Ruppach, H., Gehring, S., Knechten, H., Knickmann, M., Jager, H., Wolf, E., Husak, R., Orfanos, C. E., Brede, H. D., Rubsamen-Waigmann, H., and von Briesen, H.: Large proportion of non-B HIV-1 subtypes and presence of zidovudine resistance mutations among German seroconvertors. *AIDS (London, England)* 11: 1532-3, 1997
- Divi, R. L., Walker, V. E., Wade, N. A., Nagashima, K., Seilkop, S. K., Adams, M. E., Nesel, C. J., O'Neill, J. P., Abrams, E. J., and Poirier, M. C.: Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exposed in utero to Combivir. *AIDS (London, England)* 18: 1013-21, 2004
- Dominguez, K. L., Lindegren, M. L., D'Almada, P. J., Peters, V. B., Frederick, T., Rakusan, T. A., Ortiz, I. R., Hsu, H. W., Melville, S. K., Sadek, R., and Fowler, M. G.: Increasing trend of Cesarean deliveries in HIV-infected women in the United States from 1994 to 2000. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 33: 232-8, 2003
- Douek, D. C., Brenchley, J. M., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Okamoto, Y., Casazza, J. P., Kuruppu, J., Kunstman, K., Wolinsky, S., Grossman, Z., Dybul, M., Oxenius, A., Price, D. A., Connors, M., and Koup, R. A.: HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 417: 95-8, 2002
- Douglas, G. C. and King, B. F.: Maternal-fetal transmission of human immunodeficiency virus: a review of possible routes and cellular mechanisms of infection. *Clinical infectious diseases* 15: 678-91, 1992

- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., and Paxton, W. A.: HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381: 667-73, 1996
- Dummer, J. S., Erb, S., Breinig, M. K., Ho, M., Rinaldo, C. R., Jr., Gupta, P., Ragni, M. V., Tzakis, A., Makowka, L., Van Thiel, D., and et al.: Infection with human immunodeficiency virus in the Pittsburgh transplant population. A study of 583 donors and 1043 recipients, 1981-1986. *Transplantation* 47: 134-40, 1989
- Dunn, D. T., Brandt, C. D., Krivine, A., Cassol, S. A., Roques, P., Borkowsky, W., De Rossi, A., Denamur, E., Ehrnst, A., and Loveday, C.: The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. *AIDS (London, England)* 9: F7-11, 1995
- Dunn, D. T., Newell, M. L., Ades, A. E., and Peckham, C. S.: Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. *Lancet* 340: 585-8, 1992
- Durali, D., Morvan, J., Letourneur, F., Schmitt, D., Guegan, N., Dalod, M., Saragosti, S., Sicard, D., Levy, J. P., and Gomard, E.: Cross-reactions between the cytotoxic T-lymphocyte responses of human immunodeficiency virus-infected African and European patients. *Journal of virology* 72: 3547-53, 1998
- Dyer, W. B., Ogg, G. S., Demoitie, M. A., Jin, X., Geczy, A. F., Rowland-Jones, S. L., McMichael, A. J., Nixon, D. F., and Sullivan, J. S.: Strong human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in Sydney Blood Bank Cohort patients infected with nef-defective HIV type 1. *Journal of virology* 73: 436-43, 1999
- Eastman, P. S., Shapiro, D. E., Coombs, R. W., Frenkel, L. M., McSherry, G. D., Britto, P., Herman, S. A., and Sperling, R. S.: Maternal viral genotypic zidovudine resistance and infrequent failure of zidovudine therapy to prevent perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076. *The Journal of infectious diseases* 177: 557-64, 1998
- Edelstein, R. E., Arcuino, L. A., Hughes, J. P., Melvin, A. J., Mohan, K. M., King, P. D., McLellan, C. L., Murante, B. L., Kassman, B. P., and Frenkel, L. M.: Risk of mother-to-infant transmission of HIV-1 is not reduced in CCR5/delta32ccr5 heterozygotes. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* 16: 243-6, 1997
- Edinger, A. L., Hoffman, T. L., Sharron, M., Lee, B., O'Dowd, B., and Doms, R. W.: Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* 249: 367-78, 1998
- El Beitune, P., Duarte, G., Foss, M. C., Montenegro, R. M., Jr., Spara, P., Quintana, S. M., Figueiro-Filho, E. A., da Costa, A. G., and Filho, F. M.: Effect of antiretroviral

- agents on carbohydrate metabolism in HIV-1 infected pregnant women. *Diabetes/metabolism research and reviews* 22: 59-63, 2006
- El-Beitune, P., Duarte, G., and dos Santos, J. E.: Effect of antiretroviral agents on triglyceride levels in HIV-1-infected pregnant women. *Lipids* 41: 405-6, 2006
- Embree, J. E., Njenga, S., Datta, P., Nagelkerke, N. J., Ndinya-Achola, J. O., Mohammed, Z., Ramdahin, S., Bwayo, J. J., and Plummer, F. A.: Risk factors for postnatal mother-child transmission of HIV-1. *AIDS (London, England)* 14: 2535-41, 2000
- Eshleman, S. H., Guay, L. A., Mwatha, A., Brown, E. R., Cunningham, S. P., Musoke, P., Mmiro, F., and Jackson, J. B.: Characterization of nevirapine resistance mutations in women with subtype A vs. D HIV-1 6-8 weeks after single-dose nevirapine (HIVNET 012). *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 35: 126-30, 2004a
- Eshleman, S. H., Guay, L. A., Mwatha, A., Cunningham, S. P., Brown, E. R., Musoke, P., Mmiro, F., and Jackson, J. B.: Comparison of nevirapine (NVP) resistance in Ugandan women 7 days vs. 6-8 weeks after single-dose nvp prophylaxis: HIVNET 012. *AIDS research and human retroviruses* 20: 595-9, 2004b
- Essex, M., McLane, M. F., Lee, T. H., Falk, L., Howe, C. W., Mullins, J. I., Cabradilla, C., and Francis, D. P.: Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS. *Science* 220: 859-62, 1983
- Esteves, A., Parreira, R., Venenno, T., Franco, M., Piedade, J., Germano De Sousa, J., and Canas-Ferreira, W. F.: Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS research and human retroviruses* 18: 313-25, 2002
- Fang, G., Weiser, B., Kuiken, C., Philpott, S. M., Rowland-Jones, S., Plummer, F., Kimani, J., Shi, B., Kaul, R., Bwayo, J., Anzala, O., and Burger, H.: Recombination following superinfection by HIV-1. *AIDS (London, England)* 18: 153-9, 2004
- Fauci, A. S.: The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239: 617-22, 1988
- Fauci, A. S.: The AIDS epidemic--considerations for the 21st century. *The New England journal of medicine* 341: 1046-50, 1999
- Fauci, A. S., Pantaleo, G., Stanley, S., and Weissman, D.: Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Annals of internal medicine* 124: 654-63, 1996
- Fawzi, W. W., Msamanga, G., Hunter, D., Urassa, E., Renjifo, B., Mwakagile, D., Hertzmark, E., Coley, J., Garland, M., Kapiga, S., Antelman, G., Essex, M., and Spiegelman, D.: Randomized trial of vitamin supplements in relation to vertical transmission of HIV-1 in Tanzania. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 23: 246-54, 2000
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A.: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-7, 1996
- Ferrantelli, F., Hofmann-Lehmann, R., Rasmussen, R. A., Wang, T., Xu, W., Li, P. L., Montefiori, D. C., Cavacini, L. A., Katinger, H., Stiegler, G., Anderson, D. C.,

- McClure, H. M., and Ruprecht, R. M.: Post-exposure prophylaxis with human monoclonal antibodies prevented SHIV89.6P infection or disease in neonatal macaques. *AIDS (London, England)* 17: 301-9, 2003
- Ferrari, G., Humphrey, W., McElrath, M. J., Excler, J. L., Duliege, A. M., Clements, M. L., Corey, L. C., Bolognesi, D. P., and Weinhold, K. J.: Clade B-based HIV-1 vaccines elicit cross-clade cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 1396-401, 1997
- Ferrero, S. and Bentivoglio, G.: Post-operative complications after caesarean section in HIV-infected women. *Archives of gynecology and obstetrics* 268: 268-73, 2003
- Fiddes, T. M., O'Reilly, D. B., Cetrulo, C. L., Miller, W., Rudders, R., Osband, M., and Rocklin, R. E.: Phenotypic and functional evaluation of suppressor cells in normal pregnancy and in chronic aborters. *Cellular immunology* 97: 407-18, 1986
- Fiore, S., Newell, M. L., and Thorne, C.: Higher rates of post-partum complications in HIV-infected than in uninfected women irrespective of mode of delivery. *AIDS (London, England)* 18: 933-8, 2004
- Flys, T., Nissley, D. V., Claasen, C. W., Jones, D., Shi, C., Guay, L. A., Musoke, P., Mmimo, F., Strathern, J. N., Jackson, J. B., Eshleman, J. R., and Eshleman, S. H.: Sensitive drug-resistance assays reveal long-term persistence of HIV-1 variants with the K103N nevirapine (NVP) resistance mutation in some women and infants after the administration of single-dose NVP: HIVNET 012. *The Journal of infectious diseases* 192: 24-9, 2005
- Frahm, N., Adams, S., Kiepiela, P., Linde, C. H., Hewitt, H. S., Lichterfeld, M., Sango, K., Brown, N. V., Pae, E., Wurcel, A. G., Altfeld, M., Feeney, M. E., Allen, T. M., Roach, T., St John, M. A., Daar, E. S., Rosenberg, E., Korber, B., Marincola, F., Walker, B. D., Goulder, P. J., and Brander, C.: HLA-B63 presents HLA-B57/B58-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes and is associated with low human immunodeficiency virus load. *Journal of virology* 79: 10218-25, 2005
- Frahm, N., Korber, B. T., Adams, C. M., Szinger, J. J., Draenert, R., Addo, M. M., Feeney, M. E., Yusim, K., Sango, K., Brown, N. V., SenGupta, D., Piechocka-Trocha, A., Simonis, T., Marincola, F. M., Wurcel, A. G., Stone, D. R., Russell, C. J., Adolf, P., Cohen, D., Roach, T., StJohn, A., Khatri, A., Davis, K., Mullins, J., Goulder, P. J., Walker, B. D., and Brander, C.: Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *Journal of virology* 78: 2187-200, 2004
- Fransen, K., Buve, A., Nkengasong, J. N., Laga, M., and van der Groen, G.: Longstanding presence in Belgians of multiple non-B HIV-1 subtypes. *Lancet* 347: 1403, 1996
- Gaillard, P., Mwanjumba, F., Verhofstede, C., Claeys, P., Chohan, V., Goetghebeur, E., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J., and Temmerman, M.: Vaginal lavage with chlorhexidine during labour to reduce mother-to-child HIV transmission: clinical trial in Mombasa, Kenya. *AIDS (London, England)* 15: 389-96, 2001

- Galli, L., de Martino, M., Tovo, P. A., Gabiano, C., Zappa, M., Giaquinto, C., Tulisso, S., Vierucci, A., Guerra, M., Marchisio, P., and et al.: Onset of clinical signs in children with HIV-1 perinatal infection. Italian Register for HIV Infection in Children. *AIDS (London, England)* 9: 455-61, 1995
- Gallimore, A., Cranage, M., Cook, N., Almond, N., Bootman, J., Rud, E., Silvera, P., Dennis, M., Corcoran, T., Stott, J., and et al.: Early suppression of SIV replication by CD8⁺ nef-specific cytotoxic T cells in vaccinated macaques. *Nature medicine* 1: 1167-73, 1995
- Garcia, J. V. and Miller, A. D.: Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Research in virology* 143: 52-5, 1992
- Garcia, P. M., Kalish, L. A., Pitt, J., Minkoff, H., Quinn, T. C., Burchett, S. K., Kornegay, J., Jackson, B., Moye, J., Hanson, C., Zorrilla, C., and Lew, J. F.: Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *The New England journal of medicine* 341: 394-402, 1999
- Geels, M. J., Cornelissen, M., Schuitemaker, H., Anderson, K., Kwa, D., Maas, J., Dekker, J. T., Baan, E., Zorgdrager, F., van den Burg, R., van Beelen, M., Lukashov, V. V., Fu, T. M., Paxton, W. A., van der Hoek, L., Dubey, S. A., Shiver, J. W., and Goudsmit, J.: Identification of sequential viral escape mutants associated with altered T-cell responses in a human immunodeficiency virus type 1-infected individual. *Journal of virology* 77: 12430-40, 2003
- Gehrz, R. C., Christianson, W. R., Linner, K. M., Conroy, M. M., McCue, S. A., and Balfour, H. H., Jr.: Cytomegalovirus-specific humoral and cellular immune responses in human pregnancy. *The Journal of infectious diseases* 143: 391-5, 1981
- Gilbert, M. T., Rambaut, A., Wlasiuk, G., Spira, T. J., Pitchenik, A. E., and Worobey, M.: The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 18566-70, 2007
- Gillies, P., Slack, R., Stoddart, N., and Conway, S.: HIV-related risk behaviour in UK holiday-makers. *AIDS (London, England)* 6: 339-41, 1992
- Glinioer, D.: What happens to the normal thyroid during pregnancy? *Thyroid* 9: 631-5, 1999
- Goedert, J. J., Duliege, A. M., Amos, C. I., Felton, S., and Biggar, R. J.: High risk of HIV-1 infection for first-born twins. The International Registry of HIV-exposed Twins. *Lancet* 338: 1471-5, 1991
- Goedert, J. J., Mendez, H., Drummond, J. E., Robert-Guroff, M., Minkoff, H. L., Holman, S., Stevens, R., Rubinstein, A., Blattner, W. A., Willoughby, A., and et al.: Mother-to-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1: association with prematurity or low anti-gp120. *Lancet* 2: 1351-4, 1989
- Goh, W. C., Markee, J., Akridge, R. E., Meldorf, M., Musey, L., Karchmer, T., Krone, M., Collier, A., Corey, L., Emerman, M., and McElrath, M. J.: Protection against human immunodeficiency virus type 1 infection in persons with repeated exposure: evidence for T cell immunity in the absence of inherited CCR5 coreceptor defects. *The Journal of infectious diseases* 179: 548-57, 1999

- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A.: Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 305: 1425-31, 1981
- Goulder, P. J., Phillips, R. E., Colbert, R. A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M. A., Giangrande, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., McMichael, A. J., and Rowland-Jones, S.: Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nature medicine* 3: 212-7, 1997
- Gray, C. M., Schapiro, J. M., Winters, M. A., and Merigan, T. C.: Changes in CD4+ and CD8+ T cell subsets in response to highly active antiretroviral therapy in HIV type 1-infected patients with prior protease inhibitor experience. *AIDS research and human retroviruses* 14: 561-9, 1998
- Greenough, T. C., Brettler, D. B., Somasundaran, M., Panicali, D. L., and Sullivan, J. L.: Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo. *The Journal of infectious diseases* 176: 118-25, 1997
- Grimbert, S., Fromenty, B., Fisch, C., Letteron, P., Berson, A., Durand-Schneider, A. M., Feldmann, G., and Pessayre, D.: Decreased mitochondrial oxidation of fatty acids in pregnant mice: possible relevance to development of acute fatty liver of pregnancy. *Hepatology (Baltimore, Md)* 17: 628-37, 1993
- Guay, L. A., Musoke, P., Fleming, T., Bagenda, D., Allen, M., Nakabiito, C., Sherman, J., Bakaki, P., Ducar, C., Deseyve, M., Emel, L., Mirochnick, M., Fowler, M. G., Mofenson, L., Miotti, P., Dransfield, K., Bray, D., Mmiro, F., and Jackson, J. B.: Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* 354: 795-802, 1999
- Guevara, H., Casseb, J., Zijenah, L. S., Mbizvo, M., Ocegüera, L. F., 3rd, Hanson, C. V., Katzenstein, D. A., and Hendry, R. M.: Maternal HIV-1 antibody and vertical transmission in subtype C virus infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 29: 435-40, 2002
- Haas, G., Plikat, U., Debre, P., Lucchiari, M., Katlama, C., Dudoit, Y., Bonduelle, O., Bauer, M., Ihlenfeldt, H. G., Jung, G., Maier, B., Meyerhans, A., and Autran, B.: Dynamics of viral variants in HIV-1 Nef and specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md)* 157: 4212-21, 1996
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M., and Sharp, P. M.: AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287: 607-14, 2000
- Halsey, N. A., Markham, R., Wahren, B., Boulos, R., Rossi, P., and Wigzell, H.: Lack of association between maternal antibodies to V3 loop peptides and maternal-infant HIV-1 transmission. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 5: 153-7, 1992

- Havlir, D. V., Eastman, S., Gamst, A., and Richman, D. D.: Nevirapine-resistant human immunodeficiency virus: kinetics of replication and estimated prevalence in untreated patients. *Journal of virology* 70: 7894-9, 1996
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D. O., and Landau, N. R.: Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *Journal of virology* 69: 6705-11, 1995
- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M.: The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7311-5, 1994
- Henin, Y., Mandelbrot, L., Henrion, R., Pradinaud, R., Coulaud, J. P., and Montagnier, L.: Virus excretion in the cervicovaginal secretions of pregnant and nonpregnant HIV-infected women. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 6: 72-5, 1993
- Henkart, P. A., Williams, M. S., and Nakajima, H.: Degranulating cytotoxic lymphocytes inflict multiple damage pathways on target cells. *Current topics in microbiology and immunology* 198: 75-93, 1995
- Herbein, G., Mahlknecht, U., Batliwalla, F., Gregersen, P., Pappas, T., Butler, J., O'Brien, W. A., and Verdin, E.: Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* 395: 189-94, 1998
- Heveker, N.: Chemokine receptors as anti-retroviral targets. *Current drug targets* 2: 21-39, 2001
- Hill, C. M., Deng, H., Unutmaz, D., Kewalramani, V. N., Bastiani, L., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S., and Littman, D. R.: Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptor. *Journal of virology* 71: 6296-304, 1997
- Ho, D. D., Sarngadharan, M. G., Hirsch, M. S., Schooley, R. T., Rota, T. R., Kennedy, R. C., Chanh, T. C., and Sato, V. L.: Human immunodeficiency virus neutralizing antibodies recognize several conserved domains on the envelope glycoproteins. *Journal of virology* 61: 2024-8, 1987
- Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Rasmussen, R. A., Smith, B. A., Baba, T. W., Liska, V., Ferrantelli, F., Montefiori, D. C., McClure, H. M., Anderson, D. C., Bernacky, B. J., Rizvi, T. A., Schmidt, R., Hill, L. R., Keeling, M. E., Katinger, H., Stiegler, G., Cavacini, L. A., Posner, M. R., Chou, T. C., Andersen, J., and Ruprecht, R. M.: Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *Journal of virology* 75: 7470-80, 2001
- Horton, H., Vogel, T. U., Carter, D. K., Vielhuber, K., Fuller, D. H., Shipley, T., Fuller, J. T., Kunstman, K. J., Sutter, G., Montefiori, D. C., Erfle, V., Desrosiers, R. C., Wilson, N., Picker, L. J., Wolinsky, S. M., Wang, C., Allison, D. B., and Watkins,

- D. I.: Immunization of rhesus macaques with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen induces broad simian immunodeficiency virus (SIV)-specific T-cell responses and reduces initial viral replication but does not prevent disease progression following challenge with pathogenic SIVmac239. *Journal of virology* 76: 7187-202, 2002
- Hu, D. J., Subbarao, S., Vanichseni, S., Mock, P. A., Ramos, A., Nguyen, L., Chaowanachan, T., Griensven, F., Choopanya, K., Mastro, T. D., and Tappero, J. W.: Frequency of HIV-1 dual subtype infections, including intersubtype superinfections, among injection drug users in Bangkok, Thailand. *AIDS (London, England)* 19: 303-8, 2005
- Ioannidis, J. P., Abrams, E. J., Ammann, A., Bulterys, M., Goedert, J. J., Gray, L., Korber, B. T., Mayaux, M. J., Mofenson, L. M., Newell, M. L., Shapiro, D. E., Teglas, J. P., and Wilfert, C. M.: Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads <1000 copies/ml. *The Journal of infectious diseases* 183: 539-45, 2001
- Jackson, J. B., Becker-Pergola, G., Guay, L. A., Musoke, P., Mracna, M., Fowler, M. G., Mofenson, L. M., Mirochnick, M., Mmiro, F., and Eshleman, S. H.: Identification of the K103N resistance mutation in Ugandan women receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission. *AIDS (London, England)* 14: F111-5, 2000
- Jackson, J. B., Musoke, P., Fleming, T., Guay, L. A., Bagenda, D., Allen, M., Nakabiito, C., Sherman, J., Bakaki, P., Owor, M., Ducar, C., Deseyve, M., Mwatha, A., Emel, L., Duefield, C., Mirochnick, M., Fowler, M. G., Mofenson, L., Miotti, P., Gigliotti, M., Bray, D., and Mmiro, F.: Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* 362: 859-68, 2003
- Javaherian, K., Langlois, A. J., LaRosa, G. J., Profy, A. T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C., Putney, S. D., and Matthews, T. J.: Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* 250: 1590-3, 1990
- Jin, X., Roberts, C. G., Nixon, D. F., Cao, Y., Ho, D. D., Walker, B. D., Muldoon, M., Korber, B. T., and Koup, R. A.: Longitudinal and cross-sectional analysis of cytotoxic T lymphocyte responses and their relationship to vertical human immunodeficiency virus transmission. ARIEL Project Investigators. *The Journal of infectious diseases* 178: 1317-26, 1998
- John, G. C., Nduati, R. W., Mbori-Ngacha, D., Overbaugh, J., Welch, M., Richardson, B. A., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J., Krieger, J., Onyango, F., and Kreiss, J. K.: Genital shedding of human immunodeficiency virus type 1 DNA during pregnancy: association with immunosuppression, abnormal cervical or vaginal discharge, and severe vitamin A deficiency. *The Journal of infectious diseases* 175: 57-62, 1997
- Johnson, V. A., Petropoulos, C. J., Woods, C. R., Hazelwood, J. D., Parkin, N. T., Hamilton, C. D., and Fiscus, S. A.: Vertical transmission of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and continued evolution of drug

- resistance in an HIV-1-infected infant. *The Journal of infectious diseases* 183: 1688-93, 2001
- Jonassen, T. O., Stene-Johansen, K., Berg, E. S., Hungnes, O., Lindboe, C. F., Froland, S. S., and Grinde, B.: Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology* 231: 43-7, 1997
- Jones, N. A., Wei, X., Flower, D. R., Wong, M., Michor, F., Saag, M. S., Hahn, B. H., Nowak, M. A., Shaw, G. M., and Borrow, P.: Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *The Journal of experimental medicine* 200: 1243-56, 2004
- Jost, S., Bernard, M. C., Kaiser, L., Yerly, S., Hirschel, B., Samri, A., Autran, B., Goh, L. E., and Perrin, L.: A patient with HIV-1 superinfection. *The New England journal of medicine* 347: 731-6, 2002
- Jowett, J. B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N. P., Chen, M. L., and Chen, I. S.: The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *Journal of virology* 69: 6304-13, 1995
- Jung, A., Maier, R., Vartanian, J. P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S., and Meyerhans, A.: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* 418: 144, 2002
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H.: Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annual review of immunology* 14: 207-32, 1996
- Kaleebu, P., French, N., Mahe, C., Yirrell, D., Watera, C., Lyagoba, F., Nakiyingi, J., Rutebemberwa, A., Morgan, D., Weber, J., Gilks, C., and Whitworth, J.: Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *The Journal of infectious diseases* 185: 1244-50, 2002
- Kalish, L. A., Pitt, J., Lew, J., Landesman, S., Diaz, C., Hershov, R., Hollinger, F. B., Pagano, M., Smeriglio, V., and Moye, J.: Defining the time of fetal or perinatal acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection on the basis of age at first positive culture. Women and Infants Transmission Study (WITS). *The Journal of infectious diseases* 175: 712-5, 1997
- Kalish, M. L., Luo, C. C., Weniger, B. G., Limpakarnjanarat, K., Young, N., Ou, C. Y., and Schochetman, G.: Early HIV type 1 strains in Thailand were not responsible for the current epidemic. *AIDS research and human retroviruses* 10: 1573-5, 1994
- Kane, F., Alary, M., Ndoye, I., Coll, A. M., M'Boup, S., Gueye, A., Kanki, P. J., and Joly, J. R.: Temporary expatriation is related to HIV-1 infection in rural Senegal. *AIDS (London, England)* 7: 1261-5, 1993
- Kanki, P. J., Hamel, D. J., Sankale, J. L., Hsieh, C., Thior, I., Barin, F., Woodcock, S. A., Gueye-Ndiaye, A., Zhang, E., Montano, M., Siby, T., Marlink, R., I, N. D., Essex, M. E., and S, M. B.: Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *The Journal of infectious diseases* 179: 68-73, 1999

- Katsikis, P. D., Wunderlich, E. S., Smith, C. A., and Herzenberg, L. A.: Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *The Journal of experimental medicine* 181: 2029-36, 1995
- Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M., and Hahn, B. H.: Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-6, 2006
- Keet, I. P., Krijnen, P., Koot, M., Lange, J. M., Miedema, F., Goudsmit, J., and Coutinho, R. A.: Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters. *AIDS (London, England)* 7: 51-7, 1993
- Kelleher, A. D., Long, C., Holmes, E. C., Allen, R. L., Wilson, J., Conlon, C., Workman, C., Shaunak, S., Olson, K., Goulder, P., Brander, C., Ogg, G., Sullivan, J. S., Dyer, W., Jones, I., McMichael, A. J., Rowland-Jones, S., and Phillips, R. E.: Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of experimental medicine* 193: 375-86, 2001
- Kesson, A. M., Fear, W. R., Kazazi, F., Mathijs, J. M., Chang, J., King, N. J., and Cunningham, A. L.: Human immunodeficiency virus type 1 infection of human placental macrophages in vitro. *The Journal of infectious diseases* 168: 571-9, 1993
- Kestler, H. W., 3rd, Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., and Desrosiers, R. C.: Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65: 651-62, 1991
- Kiepiela, P., Leslie, A. J., Honeyborne, I., Ramduth, D., Thobakgale, C., Chetty, S., Rathnavalu, P., Moore, C., Pfafferott, K. J., Hilton, L., Zimbwa, P., Moore, S., Allen, T., Brander, C., Addo, M. M., Altfeld, M., James, I., Mallal, S., Bunce, M., Barber, L. D., Szinger, J., Day, C., Klenerman, P., Mullins, J., Korber, B., Coovadia, H. M., Walker, B. D., and Goulder, P. J.: Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432: 769-75, 2004
- Kilpatrick, D. C., Hague, R. A., Yap, P. L., and Mok, J. Y.: HLA antigen frequencies in children born to HIV-infected mothers. *Disease markers* 9: 21-6, 1991
- Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J., and Baltimore, D.: Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *Journal of virology* 63: 3708-13, 1989
- Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C.: Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *The New England journal of medicine* 332: 228-32, 1995
- Klein, M. R., van Baalen, C. A., Holwerda, A. M., Kerkhof Garde, S. R., Bende, R. J., Keet, I. P., Eeftink-Schattenkerk, J. K., Osterhaus, A. D., Schuitemaker, H., and Miedema, F.: Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and

- long-term asymptomatics. *The Journal of experimental medicine* 181: 1365-72, 1995
- Kliks, S. C., Wara, D. W., Landers, D. V., and Levy, J. A.: Features of HIV-1 that could influence maternal-child transmission. *Jama* 272: 467-74, 1994
- Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M. D., Martin, M. A., and Orenstein, J. M.: The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *Journal of virology* 64: 621-9, 1990
- Koch, W. H., Sullivan, P. S., Roberts, C., Francis, K., Downing, R., Mastro, T. D., Nkengasong, J., Hu, D., Masciotra, S., Schable, C., and Lal, R. B.: Evaluation of United States-licensed human immunodeficiency virus immunoassays for detection of group M viral variants. *Journal of clinical microbiology* 39: 1017-20, 2001
- Koelsch, K. K., Smith, D. M., Little, S. J., Ignacio, C. C., Macaranas, T. R., Brown, A. J., Petropoulos, C. J., Richman, D. D., and Wong, J. K.: Clade B HIV-1 superinfection with wild-type virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *AIDS (London, England)* 17: F11-6, 2003
- Kostrakis, L. G., Cao, Y., Ngai, H., Moore, J. P., and Ho, D. D.: Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F, and I: lack of direct correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement. *Journal of virology* 70: 445-58, 1996
- Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D. D.: Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of virology* 68: 4650-5, 1994
- Kreiss, J.: Breastfeeding and vertical transmission of HIV-1. *Acta paediatrica (Oslo, Norway)* 421: 113-7, 1997
- Kuhn, L., Abrams, E. J., Chinchilla, M., Tsai, W. Y., and Thea, D. M.: Sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period. The New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS (London, England)* 10: 1181-2, 1996
- Kuhn, L., Abrams, E. J., Palumbo, P., Bulterys, M., Aga, R., Louie, L., and Hodge, T.: Maternal versus paternal inheritance of HLA class I alleles among HIV-infected children: consequences for clinical disease progression. *AIDS (London, England)* 18: 1281-9, 2004
- Kuhnert, M., Strohmeier, R., Stegmuller, M., and Halberstadt, E.: Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 76: 147-51, 1998
- Kumar, A., Madden, D. L., and Nankervis, G. A.: Humoral and cell-mediated immune responses to herpesvirus antigens during pregnancy--a longitudinal study. *Journal of clinical immunology* 4: 12-7, 1984
- Kvale, D., Aukrust, P., Osnes, K., Muller, F., and Froland, S. S.: CD4+ and CD8+ lymphocytes and HIV RNA in HIV infection: high baseline counts and in particular

- rapid decrease of CD8+ lymphocytes predict AIDS. *AIDS (London, England)* 13: 195-201, 1999
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A.: Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393: 648-59, 1998
- Lagaye, S., Derrien, M., Menu, E., Coito, C., Tresoldi, E., Mauclore, P., Scarlatti, G., Chaouat, G., Barre-Sinoussi, F., and Bomsel, M.: Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *Journal of virology* 75: 4780-91, 2001
- Lambert, J. S., McNamara, J., Katz, S. L., Fenton, T., Kang, M., VanCott, T. C., Livingston, R., Hawkins, E., Moye, J., Jr., Borkowsky, W., Johnson, D., Yogev, R., Duliege, A. M., Francis, D., Gershon, A., Wara, D., Martin, N., Levin, M., McSherry, G., and Smith, G.: Safety and immunogenicity of HIV recombinant envelope vaccines in HIV-infected infants and children. National Institutes of Health-sponsored Pediatric AIDS Clinical Trials Group (ACTG-218). *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* 19: 451-61, 1998
- Lamers, S. L., Sleasman, J. W., She, J. X., Barrie, K. A., Pomeroy, S. M., Barrett, D. J., and Goodenow, M. M.: Independent variation and positive selection in env V1 and V2 domains within maternal-infant strains of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Journal of virology* 67: 3951-60, 1993
- Landau, N. R., Warton, M., and Littman, D. R.: The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* 334: 159-62, 1988
- Landesman, S. H., Kalish, L. A., Burns, D. N., Minkoff, H., Fox, H. E., Zorrilla, C., Garcia, P., Fowler, M. G., Mofenson, L., and Tuomala, R.: Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to child. The Women and Infants Transmission Study. *The New England journal of medicine* 334: 1617-23, 1996
- Lapointe, N., Michaud, J., Pekovic, D., Chausseau, J. P., and Dupuy, J. M.: Transplacental transmission of HTLV-III virus. *The New England journal of medicine* 312: 1325-6, 1985
- Lasky, M., Perret, J. L., Peeters, M., Bibollet-Ruche, F., Liegeois, F., Patrel, D., Molinier, S., Gras, C., and Delaporte, E.: Presence of multiple non-B subtypes and divergent subtype B strains of HIV-1 in individuals infected after overseas deployment. *AIDS (London, England)* 11: 43-51, 1997
- Lathey, J. L., Tsou, J., Brinker, K., Hsia, K., Meyer, W. A., 3rd, and Spector, S. A.: Lack of autologous neutralizing antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and macrophage tropism are associated with mother-to-infant transmission. *The Journal of infectious diseases* 180: 344-50, 1999

- Le Chenadec, J., Mayaux, M. J., Guihenneuc-Jouyaux, C., and Blanche, S.: Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS (London, England)* 17: 2053-61, 2003
- Le Gall, S., Erdtmann, L., Benichou, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L., Benarous, R., Heard, J. M., and Schwartz, O.: Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* 8: 483-95, 1998
- Lederman, M. M.: Cell-mediated immunity and pregnancy. *Chest* 86: 6S-9S, 1984
- Leith, J., Piliero, P., Storfer, S., Mayers, D., and Hinzmann, R.: Appropriate use of nevirapine for long-term therapy. *The Journal of infectious diseases* 192: 545-6; author reply 546, 2005
- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., and Oshiro, L. S.: Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840-2, 1984
- Lewis, P., Nduati, R., Kreiss, J. K., John, G. C., Richardson, B. A., Mbori-Ngacha, D., Ndinya-Achola, J., and Overbaugh, J.: Cell-free human immunodeficiency virus type 1 in breast milk. *The Journal of infectious diseases* 177: 34-9, 1998
- Lichterfeld, M., Yu, X. G., Cohen, D., Addo, M. M., Malenfant, J., Perkins, B., Pae, E., Johnston, M. N., Strick, D., Allen, T. M., Rosenberg, E. S., Korber, B., Walker, B. D., and Altfeld, M.: HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity. *AIDS (London, England)* 18: 1383-92, 2004
- Lin, H. H., Gaschen, B. K., Collie, M., El-Fishaway, M., Chen, Z., Korber, B. T., Beatrice, S. T., and Zhang, L.: Genetic characterization of diverse HIV-1 strains in an immigrant population living in New York City. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 41: 399-404, 2006
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., and Landau, N. R.: Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86: 367-77, 1996
- Lorenzi, P., Spicher, V. M., Laubereau, B., Hirschel, B., Kind, C., Rudin, C., Irion, O., and Kaiser, L.: Antiretroviral therapies in pregnancy: maternal, fetal and neonatal effects. Swiss HIV Cohort Study, the Swiss Collaborative HIV and Pregnancy Study, and the Swiss Neonatal HIV Study. *AIDS (London, England)* 12: F241-7, 1998
- Lu, S., Arthos, J., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Manson, K., Mustafa, F., Johnson, E., Santoro, J. C., Wissink, J., Mullins, J. I., Haynes, J. R., Letvin, N. L., Wyand, M., and Robinson, H. L.: Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *Journal of virology* 70: 3978-91, 1996
- Luria, S., Chambers, I., and Berg, P.: Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of

- interleukin 2 mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 5326-30, 1991
- MacDonald, K. S., Embree, J., Njenga, S., Nagelkerke, N. J., Ngatia, I., Mohammed, Z., Barber, B. H., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J., and Plummer, F. A.: Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *The Journal of infectious diseases* 177: 551-6, 1998
- Maddon, P. J., Dalgleish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., and Axel, R.: The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47: 333-48, 1986
- Magder, L. S., Mofenson, L., Paul, M. E., Zorrilla, C. D., Blattner, W. A., Tuomala, R. E., LaRussa, P., Landesman, S., and Rich, K. C.: Risk factors for in utero and intrapartum transmission of HIV. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 38: 87-95, 2005
- Mandl, C. W., Aberle, S. W., Henkel, J. H., Puchhammer-Stockl, E., and Heinz, F. X.: Possible influence of the mutant CCR5 Allele on vertical transmission of HIV-1. *Journal of medical virology* 55: 51-5, 1998
- Mangano, A., Prada, F., Roldan, A., Picchio, G., Bologna, R., and Sen, L.: Distribution of CCR-5 delta32 allele in Argentinian children at risk of HIV-1 infection: its role in vertical transmission. *AIDS (London, England)* 12: 109-10, 1998
- Martin, G., Beausejour, Y., Thibodeau, J., and Tremblay, M. J.: Envelope glycoproteins are dispensable for insertion of host HLA-DR molecules within nascent human immunodeficiency virus type 1 particles. *Virology* 335: 286-90, 2005
- Martinson, J. J., Chapman, N. H., Rees, D. C., Liu, Y. T., and Clegg, J. B.: Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nature genetics* 16: 100-3, 1997
- Marzi, M., Vigano, A., Trabattoni, D., Villa, M. L., Salvaggio, A., Clerici, E., and Clerici, M.: Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clinical and experimental immunology* 106: 127-33, 1996
- Masemola, A., Mashishi, T., Khoury, 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, S. A., Sheppard, H. W., and Gray, C. M.: Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load. *Journal of virology* 78: 3233-43, 2004
- Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Stouwe, R. A., Holzman, R. S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H. W., and Cunningham-Rundles, S.: An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *The New England journal of medicine* 305: 1431-8, 1981
- Matano, T., Shibata, R., Siemon, C., Connors, M., Lane, H. C., and Martin, M. A.: Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of

- chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *Journal of virology* 72: 164-9, 1998
- Matheson, P. B., Thomas, P. A., Abrams, E. J., Pliner, V., Lambert, G., Bamji, M., Krasinski, K., Steketee, R., Chiasson, M. A., and Thea, D. M.: Heterosexual behavior during pregnancy and perinatal transmission of HIV-1. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS (London, England)* 10: 1249-56, 1996
- Matthiesen, L., Berg, G., Ernerudh, J., and Hakansson, L.: Lymphocyte subsets and mitogen stimulation of blood lymphocytes in normal pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.)* 35: 70-9, 1996
- Matthiesen, L., Berg, G., Ernerudh, J., and Skogh, T.: Lymphocyte subsets and autoantibodies in pregnancies complicated by placental disorders. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.)* 33: 31-9, 1995
- Maury, W., Potts, B. J., and Rabson, A. B.: HIV-1 infection of first-trimester and term human placental tissue: a possible mode of maternal-fetal transmission. *The Journal of infectious diseases* 160: 583-8, 1989
- Mayaux, M. J., Blanche, S., Rouzioux, C., Le Chenadec, J., Chambrin, V., Firtion, G., Allemon, M. C., Vilmer, E., Vigneron, N. C., Tricoire, J., and et al.: Maternal factors associated with perinatal HIV-1 transmission: the French Cohort Study: 7 years of follow-up observation. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* 8: 188-94, 1995
- Mayaux, M. J., Dussaix, E., Isopet, J., Rekacewicz, C., Mandelbrot, L., Ciraru-Vigneron, N., Allemon, M. C., Chambrin, V., Katlama, C., Delfraissy, J. F., and Puel, J.: Maternal virus load during pregnancy and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French perinatal cohort studies. SEROGEST Cohort Group. *The Journal of infectious diseases* 175: 172-5, 1997
- Mazzoli, S., Trabattoni, D., Lo Caputo, S., Piconi, S., Ble, C., Meacci, F., Ruzzante, S., Salvi, A., Semplici, F., Longhi, R., Fusi, M. L., Tofani, N., Biasin, M., Villa, M. L., Mazzotta, F., and Clerici, M.: HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nature medicine* 3: 1250-7, 1997
- McKeating, J. A., Shotton, C., Cordell, J., Graham, S., Balfe, P., Sullivan, N., Charles, M., Page, M., Bolmstedt, A., Olofsson, S., and et al.: Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to linear and conformation-dependent epitopes within the first and second variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Journal of virology* 67: 4932-44, 1993
- McNicholl, J. M., Smith, D. K., Qari, S. H., and Hodge, T.: Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerging infectious diseases* 3: 261-71, 1997
- Melbye, M., Biggar, R. J., Ebbesen, P., Sarngadharan, M. G., Weiss, S. H., Gallo, R. C., and Blattner, W. A.: Seroepidemiology of HTLV-III antibody in Danish

- homosexual men: prevalence, transmission, and disease outcome. *British medical journal (Clinical research ed)* 289: 573-5, 1984
- Miller, M. D., Warmerdam, M. T., Gaston, I., Greene, W. C., and Feinberg, M. B.: The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *The Journal of experimental medicine* 179: 101-13, 1994
- Mirochnick, M., Fenton, T., Gagnier, P., Pav, J., Gwynne, M., Siminski, S., Sperling, R. S., Beckerman, K., Jimenez, E., Yogev, R., Spector, S. A., and Sullivan, J. L.: Pharmacokinetics of nevirapine in human immunodeficiency virus type 1-infected pregnant women and their neonates. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 250 Team. *The Journal of infectious diseases* 178: 368-74, 1998
- Misrahi, M., Teglas, J. P., N'Go, N., Burgard, M., Mayaux, M. J., Rouzioux, C., Delfraissy, J. F., and Blanche, S.: CCR5 chemokine receptor variant in HIV-1 mother-to-child transmission and disease progression in children. French Pediatric HIV Infection Study Group. *Jama* 279: 277-80, 1998
- Mitra, D., Steiner, M., Lynch, D. H., Staiano-Coico, L., and Laurence, J.: HIV-1 upregulates Fas ligand expression in CD4+ T cells in vitro and in vivo: association with Fas-mediated apoptosis and modulation by aurointricarboxylic acid. *Immunology* 87: 581-5, 1996
- Mobley, J. E., Pollard, R. B., Schrader, S., Adler, M. H., Kelleher, T., and McLaren, C.: Virological and immunological responses to once-daily dosing of didanosine in combination with stavudine. A1454-143 Team. *AIDS (London, England)* 13: F87-93, 1999
- Mock, P. A., Shaffer, N., Bhadrakom, C., Siriwasin, W., Chotpitayasunondh, T., Chearskul, S., Young, N. L., Roongpisuthipong, A., Chinayon, P., Kalish, M. L., Parekh, B., and Mastro, T. D.: Maternal viral load and timing of mother-to-child HIV transmission, Bangkok, Thailand. Bangkok Collaborative Perinatal HIV Transmission Study Group. *AIDS (London, England)* 13: 407-14, 1999
- Mognetti, B., Moussa, M., Croitoru, J., Menu, E., Dormont, D., Roques, P., and Chaouat, G.: HIV-1 co-receptor expression on trophoblastic cells from early placentas and permissivity to infection by several HIV-1 primary isolates. *Clinical and experimental immunology* 119: 486-92, 2000
- Mohlala, B. K., Tucker, T. J., Besser, M. J., Williamson, C., Yeats, J., Smit, L., Anthony, J., and Puren, A.: Investigation of HIV in amniotic fluid from HIV-infected pregnant women at full term. *The Journal of infectious diseases* 192: 488-91, 2005
- Moore, C. B., John, M., James, I. R., Christiansen, F. T., Witt, C. S., and Mallal, S. A.: Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* 296: 1439-43, 2002
- Moore, J. P., Cao, Y., Leu, J., Qin, L., Korber, B., and Ho, D. D.: Inter- and intraclade neutralization of human immunodeficiency virus type 1: genetic clades do not correspond to neutralization serotypes but partially correspond to gp120 antigenic serotypes. *Journal of virology* 70: 427-44, 1996

- Moore, J. P., Trkola, A., Korber, B., Boots, L. J., Kessler, J. A., 2nd, McCutchan, F. E., Mascola, J., Ho, D. D., Robinson, J., and Conley, A. J.: A human monoclonal antibody to a complex epitope in the V3 region of gp120 of human immunodeficiency virus type 1 has broad reactivity within and outside clade B. *Journal of virology* 69: 122-30, 1995
- Moore, K. H., Barrett, J. E., Shaw, S., Pakes, G. E., Churchus, R., Kapoor, A., Lloyd, J., Barry, M. G., and Back, D.: The pharmacokinetics of lamivudine phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells from patients infected with HIV-1. *AIDS (London, England)* 13: 2239-50, 1999
- Mostad, S. B., Overbaugh, J., DeVange, D. M., Welch, M. J., Chohan, B., Mandaliya, K., Nyange, P., Martin, H. L., Jr., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J. J., and Kreiss, J. K.: Hormonal contraception, vitamin A deficiency, and other risk factors for shedding of HIV-1 infected cells from the cervix and vagina. *Lancet* 350: 922-7, 1997
- Munch, J., Stolte, N., Fuchs, D., Stahl-Hennig, C., and Kirchhoff, F.: Efficient class I major histocompatibility complex down-regulation by simian immunodeficiency virus Nef is associated with a strong selective advantage in infected rhesus macaques. *Journal of virology* 75: 10532-6, 2001
- Mundy, D. C., Schinazi, R. F., Gerber, A. R., Nahmias, A. J., and Randall, H. W., Jr.: Human immunodeficiency virus isolated from amniotic fluid. *Lancet* 2: 459-60, 1987
- Musoke, P., Guay, L. A., Bagenda, D., Mirochnick, M., Nakabiito, C., Fleming, T., Elliott, T., Horton, S., Dransfield, K., Pav, J. W., Murarka, A., Allen, M., Fowler, M. G., Mofenson, L., Hom, D., Mmiro, F., and Jackson, J. B.: A phase I/II study of the safety and pharmacokinetics of nevirapine in HIV-1-infected pregnant Ugandan women and their neonates (HIVNET 006). *AIDS (London, England)* 13: 479-86, 1999
- Nacsa, J., Stanton, J., Kunstman, K. J., Tsai, W. P., Watkins, D. I., Wolinsky, S. M., and Franchini, G.: Emergence of cytotoxic T lymphocyte escape mutants following antiretroviral treatment suspension in rhesus macaques infected with SIVmac251. *Virology* 305: 210-8, 2003
- Nair, P., Alger, L., Hines, S., Seiden, S., Hebel, R., and Johnson, J. P.: Maternal and neonatal characteristics associated with HIV infection in infants of seropositive women. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 6: 298-302, 1993
- Najera, I., Holguin, A., Quinones-Mateu, M. E., Munoz-Fernandez, M. A., Najera, R., Lopez-Galindez, C., and Domingo, E.: Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *Journal of virology* 69: 23-31, 1995
- Najera, I., Richman, D. D., Olivares, I., Rojas, J. M., Peinado, M. A., Perucho, M., Najera, R., and Lopez-Galindez, C.: Natural occurrence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *AIDS research and human retroviruses* 10: 1479-88, 1994

- Narita, M., Yamada, S., Kikuta, H., and Togashi, T.: Reconstitution of humoral immunity during pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.)* 44: 148-52, 2000
- Nduati, R. W., John, G. C., Richardson, B. A., Overbaugh, J., Welch, M., Ndinya-Achola, J., Moses, S., Holmes, K., Onyango, F., and Kreiss, J. K.: Human immunodeficiency virus type 1-infected cells in breast milk: association with immunosuppression and vitamin A deficiency. *The Journal of infectious diseases* 172: 1461-8, 1995
- Newell, M. L.: Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1. *AIDS (London, England)* 12: 831-7, 1998
- Newell, M. L. and Peckham, C.: Risk factors for vertical transmission of HIV-1 and early markers of HIV-1 infection in children. *AIDS (London, England)* 7 Suppl 1: S91-7, 1993
- Nielsen, C., Pedersen, C., Lundgren, J. D., and Gerstoft, J.: Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection. *AIDS (London, England)* 7: 1035-40, 1993
- Nielsen, K., Boyer, P., Dillon, M., Wafer, D., Wei, L. S., Garratty, E., Dickover, R. E., and Bryson, Y. J.: Presence of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 and HIV-1-specific antibodies in cervicovaginal secretions of infected mothers and in the gastric aspirates of their infants. *The Journal of infectious diseases* 173: 1001-4, 1996
- Nyambi, P. N., Nkengasong, J., Lewi, P., Andries, K., Janssens, W., Fransen, K., Heyndrickx, L., Piot, P., and van der Groen, G.: Multivariate analysis of human immunodeficiency virus type 1 neutralization data. *Journal of virology* 70: 6235-43, 1996
- O'Brien, S. J. and Moore, J. P.: The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunological reviews* 177: 99-111, 2000
- Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D. D., Nixon, D. F., and McMichael, A. J.: Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279: 2103-6, 1998
- Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Moss, P., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D. D., McMichael, A. J., and Nixon, D. F.: Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *Journal of virology* 73: 797-800, 1999
- Olivero, O. A., Parikka, R., Poirier, M. C., and Vahakangas, K.: 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) transplacental perfusion kinetics and DNA incorporation in normal human placentas perfused with AZT. *Mutation research* 428: 41-7, 1999a
- Olivero, O. A., Shearer, G. M., Chougnat, C. A., Kovacs, A. A., Landay, A. L., Baker, R., Stek, A. M., Khoury, M. M., Proia, L. A., Kessler, H. A., Sha, B. E., Tarone, R. E.,

- and Poirier, M. C.: Incorporation of zidovudine into leukocyte DNA from HIV-1-positive adults and pregnant women, and cord blood from infants exposed in utero. *AIDS (London, England)* 13: 919-25, 1999b
- Ollero, M., Pujol, E., Gimeno, A., Gea, A., Marquez, P., and Iturriaga, J. M.: [Risky practices associated with HIV infection of seamen who travel in sub-Saharan West Africa]. *Revista clinica espanola* 189: 416-21, 1991
- Oxenius, A., Price, D. A., Hersberger, M., Schlaepfer, E., Weber, R., Weber, M., Kundig, T. M., Boni, J., Joller, H., Phillips, R. E., Flepp, M., Opravil, M., and Speck, R. F.: HIV-specific cellular immune response is inversely correlated with disease progression as defined by decline of CD4+ T cells in relation to HIV RNA load. *The Journal of infectious diseases* 189: 1199-208, 2004
- Palker, T. J., Matthews, T. J., Langlois, A., Tanner, M. E., Martin, M. E., Searce, R. M., Kim, J. E., Berzofsky, J. A., Bolognesi, D. P., and Haynes, B. F.: Polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 142: 3612-9, 1989
- Palmer, C., Balfe, P., Fox, D., May, J. C., Frederiksson, R., Fenyo, E. M., and McKeating, J. A.: Functional characterization of the V1V2 region of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 220: 436-49, 1996
- Palmer, S., Boltz, V., Martinson, N., Maldarelli, F., Gray, G., McIntyre, J., Mellors, J., Morris, L., and Coffin, J.: Persistence of nevirapine-resistant HIV-1 in women after single-dose nevirapine therapy for prevention of maternal-to-fetal HIV-1 transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 7094-9, 2006
- Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Cohen, O. J., Demarest, J. F., Montefiori, D., Orenstein, J. M., Fox, C., Schrager, L. K., and et al.: Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine* 332: 209-16, 1995
- Parekh, B. S., Hu, D. J., Vanichseni, S., Satten, G. A., Candal, D., Young, N. L., Kitayaporn, D., Srisuwanvilai, L. O., Rakhtam, S., Janssen, R., Choopanya, K., and Mastro, T. D.: Evaluation of a sensitive/less-sensitive testing algorithm using the 3A11-LS assay for detecting recent HIV seroconversion among individuals with HIV-1 subtype B or E infection in Thailand. *AIDS research and human retroviruses* 17: 453-8, 2001
- Patke, D. S., Langan, S. J., Carruth, L. M., Keating, S. M., Sabundayo, B. P., Margolick, J. B., Quinn, T. C., and Bollinger, R. C.: Association of Gag-specific T lymphocyte responses during the early phase of human immunodeficiency virus type 1 infection and lower virus load set point. *The Journal of infectious diseases* 186: 1177-80, 2002
- Patterson, B. K., Behbahani, H., Kabat, W. J., Sullivan, Y., O'Gorman, M. R., Landay, A., Flener, Z., Khan, N., Yogev, R., and Andersson, J.: Leukemia inhibitory factor

- inhibits HIV-1 replication and is upregulated in placentae from nontransmitting women. *The Journal of clinical investigation* 107: 287-94, 2001
- Peeters, M., Toure-Kane, C., and Nkengasong, J. N.: Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS (London, England)* 17: 2547-60, 2003
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., and Ho, D. D.: HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271: 1582-6, 1996
- Perez-Alvarez, L., Cuevas, M. T., Villahermosa, M. L., Pedreira, J. D., Manjon, N., Herrero, I., Lopez-Calvo, S., Delgado, E., de Parga, E. V., Medrano, L., Thomson, M. M., Taboada, J. A., and Najera, R.: Prevalence of drug resistance mutations in B, non-B subtypes, and recombinant forms of human immunodeficiency virus type 1 in infected individuals in Spain (Galicia). *Journal of human virology* 4: 35-8, 2001
- Petit, T., Gluckman, E., Carosella, E., Brossard, Y., Brison, O., and Socie, G.: A highly sensitive polymerase chain reaction method reveals the ubiquitous presence of maternal cells in human umbilical cord blood. *Experimental hematology* 23: 1601-5, 1995
- Petrovas, C., Casazza, J. P., Brenchley, J. M., Price, D. A., Gostick, E., Adams, W. C., Precopio, M. L., Schacker, T., Roederer, M., Douek, D. C., and Koup, R. A.: PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *The Journal of experimental medicine* 203: 2281-92, 2006
- Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R., Rizza, C. R., and et al.: Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 354: 453-9, 1991
- Philpott, S., Weiser, B., Anastos, K., Kitchen, C. M., Robison, E., Meyer, W. A., 3rd, Sacks, H. S., Mathur-Wagh, U., Brunner, C., and Burger, H.: Preferential suppression of CXCR4-specific strains of HIV-1 by antiviral therapy. *The Journal of clinical investigation* 107: 431-8, 2001
- Piccinni, M. P., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Beloni, L., Giannarini, L., Sampognaro, S., Parronchi, P., Manetti, R., Annunziato, F., Livi, C., and et al.: Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 155: 128-33, 1995
- Pieniazek, D., Rayfield, M., Hu, D. J., Nkengasong, J., Wiktor, S. Z., Downing, R., Biryahwaho, B., Mastro, T., Tanuri, A., Soriano, V., Lal, R., and Dondero, T.: Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naive individuals worldwide. HIV Variant Working Group. *AIDS (London, England)* 14: 1489-95, 2000
- Piguet, V. and Sattentau, Q.: Dangerous liaisons at the virological synapse. *The Journal of clinical investigation* 114: 605-10, 2004

- Pillay, K., Coutoudis, A., York, D., Kuhn, L., and Coovadia, H. M.: Cell-free virus in breast milk of HIV-1-seropositive women. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 24: 330-6, 2000
- Pillay, T., Zhang, H. T., Drijfhout, J. W., Robinson, N., Brown, H., Khan, M., Moodley, J., Adhikari, M., Pfaffert, K., Feeney, M. E., St John, A., Holmes, E. C., Coovadia, H. M., Klenerman, P., Goulder, P. J., and Phillips, R. E.: Unique acquisition of cytotoxic T-lymphocyte escape mutants in infant human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 79: 12100-5, 2005
- Pitcher, C. J., Quittner, C., Peterson, D. M., Connors, M., Koup, R. A., Maino, V. C., and Picker, L. J.: HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nature medicine* 5: 518-25, 1999
- Plaeger, S., Bermudez, S., Mikiyas, Y., Harawa, N., Dickover, R., Mark, D., Dillon, M., Bryson, Y. J., Boyer, P. J., and Sinsheimer, J. S.: Decreased CD8 cell-mediated viral suppression and other immunologic characteristics of women who transmit human immunodeficiency virus to their infants. *The Journal of infectious diseases* 179: 1388-94, 1999
- Poirier, M. C., Divi, R. L., Al-Harthi, L., Olivero, O. A., Nguyen, V., Walker, B., Landay, A. L., Walker, V. E., Charurat, M., and Blattner, W. A.: Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 33: 175-83, 2003
- Poirier, M. C., Patterson, T. A., Slikker, W., Jr., and Olivero, O. A.: Incorporation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) into fetal DNA and fetal tissue distribution of drug after infusion of pregnant late-term rhesus macaques with a human-equivalent AZT dose. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 22: 477-83, 1999
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C.: Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500, 1984
- Preston, B. D., Poiesz, B. J., and Loeb, L. A.: Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242: 1168-71, 1988
- Price, D. A., Goulder, P. J., Klenerman, P., Sewell, A. K., Easterbrook, P. J., Troop, M., Bangham, C. R., and Phillips, R. E.: Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 1890-5, 1997
- Price, D. A., Sewell, A. K., Dong, T., Tan, R., Goulder, P. J., Rowland-Jones, S. L., and Phillips, R. E.: Antigen-specific release of beta-chemokines by anti-HIV-1 cytotoxic T lymphocytes. *Current biology* 8: 355-8, 1998
- Quinones-Mateu, M. E., Albright, J. L., Mas, A., Soriano, V., and Arts, E. J.: Analysis of pol gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 72: 9002-15, 1998

- Raghupathy, R.: Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology today* 18: 478-82, 1997
- Raghupathy, R.: Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Seminars in immunology* 13: 219-27, 2001
- Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K. A., and Holmes, E. C.: The causes and consequences of HIV evolution. *Nature reviews* 5: 52-61, 2004
- Re, F., Braaten, D., Franke, E. K., and Luban, J.: Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *Journal of virology* 69: 6859-64, 1995
- Reinhard, G., Noll, A., Schlebusch, H., Mallmann, P., and Ruecker, A. V.: Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochemical and biophysical research communications* 245: 933-8, 1998
- Reinhardt, M. C.: Effects of parasitic infections in pregnant women. *Ciba Foundation symposium*: 149-70, 1979
- Renjifo, B., Fawzi, W., Mwakagile, D., Hunter, D., Msamanga, G., Spiegelman, D., Garland, M., Kagoma, C., Kim, A., Chaplin, B., Hertzmark, E., and Essex, M.: Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *Journal of human virology* 4: 16-25, 2001
- Rich, K. C., Chang, B. H., Mofenson, L., Fowler, M. G., Cooper, E., Pitt, J., Hillyer, G. V., and Mendez, H.: Elevated CD8+DR+ lymphocytes in HIV-exposed infants with early positive HIV cultures: a possible early marker of intrauterine transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* 15: 204-10, 1997
- Richman, D. D., Havlir, D., Corbeil, J., Looney, D., Ignacio, C., Spector, S. A., Sullivan, J., Cheeseman, S., Barringer, K., Pauletti, D., and et al.: Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. *Journal of virology* 68: 1660-6, 1994
- Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J., and Petropoulos, C. J.: Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4144-9, 2003
- Riley, E. M., Schneider, G., Sambou, I., and Greenwood, B. M.: Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant Gambian women. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 40: 141-4, 1989
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., Learn, G. H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P. M., Wolinsky, S., and Korber, B.: HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288: 55-6, 2000
- Rogel, M. E., Wu, L. I., and Emerman, M.: The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *Journal of virology* 69: 882-8, 1995

- Roger, M.: Influence of host genes on HIV-1 disease progression. *The FASEB journal* 12: 625-32, 1998
- Romiti, M. L., Cancrini, C., Castelli-Gattinara, G., Di Cesare, S., Ciaffi, P., Bernardi, S., De Gasperi, M. R., Halapi, E., and Rossi, P.: Kinetics of the T-cell receptor CD4 and CD8 V beta repertoire in HIV-1 vertically infected infants early treated with HAART. *AIDS (London, England)* 15: 2075-84, 2001
- Roques, P., Marce, D., Courpotin, C., Mathieu, F. P., Herve, F., Boussin, F. D., Narwa, R., Meyohas, M. C., Dollfus, C., and Dormont, D.: Correlation between HIV provirus burden and in utero transmission. *AIDS (London, England)* 7 Suppl 2: S39-43, 1993
- Rosenberg, E. S., Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., Sax, P. E., Kalams, S. A., and Walker, B. D.: Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278: 1447-50, 1997
- Ross, H. A. and Rodrigo, A. G.: Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *Journal of virology* 76: 11715-20, 2002
- Rossi, P., Moschese, V., Broliden, P. A., Fundaro, C., Quinti, I., Plebani, A., Giaquinto, C., Tovo, P. A., Ljunggren, K., Rosen, J., and et al.: Presence of maternal antibodies to human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp120 epitopes correlates with the uninfected status of children born to seropositive mothers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 8055-8, 1989
- Rousseau, C. M., Just, J. J., Abrams, E. J., Casabona, J., Stein, Z., and King, M. C.: CCR5del32 in perinatal HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* 16: 239-42, 1997
- Rousseau, C. M., Nduati, R. W., Richardson, B. A., John-Stewart, G. C., Mbori-Ngacha, D. A., Kreiss, J. K., and Overbaugh, J.: Association of levels of HIV-1-infected breast milk cells and risk of mother-to-child transmission. *The Journal of infectious diseases* 190: 1880-8, 2004
- Rousseau, C. M., Nduati, R. W., Richardson, B. A., Steele, M. S., John-Stewart, G. C., Mbori-Ngacha, D. A., Kreiss, J. K., and Overbaugh, J.: Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 RNA in breast milk and of its relationship to infant infection and maternal disease. *The Journal of infectious diseases* 187: 741-7, 2003
- Rowland-Jones, S. L., Nixon, D. F., Aldhous, M. C., Gotch, F., Ariyoshi, K., Hallam, N., Kroll, J. S., Froebel, K., and McMichael, A.: HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* 341: 860-1, 1993
- Roy, J., Martin, G., Giguere, J. F., Belanger, D., Petrin, M., and Tremblay, M. J.: HIV type 1 can act as an APC upon acquisition from the host cell of peptide-loaded HLA-DR and CD86 molecules. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 174: 4779-88, 2005
- Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W. A., and Rosen, C. A.: Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *Journal of virology* 63: 1-8, 1989

- Rucker, J., Edinger, A. L., Sharron, M., Samson, M., Lee, B., Berson, J. F., Yi, Y., Margulies, B., Collman, R. G., Doranz, B. J., Parmentier, M., and Doms, R. W.: Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *Journal of virology* 71: 8999-9007, 1997
- Rudin, C., Meier, D., Pavic, N., Nars, P. W., Berger, R., Ohnacker, H., Probst, A., and Erb, P.: Intrauterine onset of symptomatic human immunodeficiency virus disease. The Swiss Collaborative Study Group "HIV and Pregnancy". *The Pediatric infectious disease journal* 12: 411-4, 1993
- Sabahi, F., Rola-Pleszczynski, M., O'Connell, S., and Frenkel, L. D.: Qualitative and quantitative analysis of T lymphocytes during normal human pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.)* 33: 381-93, 1995
- Safai, B., Sarngadharan, M. G., Groopman, J. E., Arnett, K., Popovic, M., Sliski, A., Schupbach, J., and Gallo, R. C.: Seroepidemiological studies of human T-lymphotropic retrovirus type III in acquired immunodeficiency syndrome. *Lancet* 1: 1438-40, 1984
- Safrit, J. T., Ruprecht, R., Ferrantelli, F., Xu, W., Kitabwalla, M., Van Rompay, K., Marthas, M., Haigwood, N., Mascola, J. R., Luzuriaga, K., Jones, S. A., Mathieson, B. J., and Newell, M. L.: Immunoprophylaxis to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 35: 169-77, 2004
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A.: Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* 22: 745-63, 2004
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M.: Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722-5, 1996
- Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Bailes, E., Kamenya, S., Muller, M. N., Lukasik, M., Pusey, A. E., Collins, D. A., Wrangham, R. W., Goodall, J., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H.: Amplification of a complete simian immunodeficiency virus genome from fecal RNA of a wild chimpanzee. *Journal of virology* 77: 2233-42, 2003
- Santoli, D., Trinchieri, G., Zmijewski, C. M., and Koprowski, H.: HLA-related control of spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity in humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 117: 765-70, 1976
- Sarngadharan, M. G., Popovic, M., Bruch, L., Schupbach, J., and Gallo, R. C.: Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 224: 506-8, 1984

- Sattentau, Q. J. and Moore, J. P.: Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *The Journal of experimental medicine* 174: 407-15, 1991
- Scarlati, G., Albert, J., Rossi, P., Hodara, V., Biraghi, P., Muggiasca, L., and Fenyo, E. M.: Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: correlation with neutralizing antibodies against primary isolates. *The Journal of infectious diseases* 168: 207-10, 1993a
- Scarlati, G., Leitner, T., Hodara, V., Halapi, E., Rossi, P., Albert, J., and Fenyo, E. M.: Neutralizing antibodies and viral characteristics in mother-to-child transmission of HIV-1. *AIDS (London, England)* 7 Suppl 2: S45-8, 1993b
- Schmitz, J. E., Kuroda, M. J., Santra, S., Sasseville, V. G., Simon, M. A., Lifton, M. A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B. J., Ghayeb, J., Forman, M. A., Montefiori, D. C., Rieber, E. P., Letvin, N. L., and Reimann, K. A.: Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283: 857-60, 1999
- Schubert, U., Bour, S., Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M., Maldarell, F., and Strebel, K.: The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *Journal of virology* 70: 809-19, 1996
- Schwartz, D. H., Sharma, U. K., Perlman, E. J., and Blakemore, K.: Adherence of human immunodeficiency virus-infected lymphocytes to fetal placental cells: a model of maternal --> fetal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 978-82, 1995
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and Heard, J. M.: Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature medicine* 2: 338-42, 1996
- Selik, R. M., Chu, S. Y., and Ward, J. W.: Trends in infectious diseases and cancers among persons dying of HIV infection in the United States from 1987 to 1992. *Annals of internal medicine* 123: 933-6, 1995
- Semba, R. D., Kumwenda, N., Hoover, D. R., Taha, T. E., Quinn, T. C., Mtimavalye, L., Biggar, R. J., Broadhead, R., Miotti, P. G., Sokoll, L. J., van der Hoeven, L., and Chipangwi, J. D.: Human immunodeficiency virus load in breast milk, mastitis, and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of infectious diseases* 180: 93-8, 1999
- Semba, R. D., Miotti, P., Chipangwi, J. D., Henderson, R., Dallabetta, G., Yang, L. P., and Hoover, D.: Maternal vitamin A deficiency and child growth failure during human immunodeficiency virus infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* 14: 219-22, 1997
- Semba, R. D., Miotti, P. G., Chipangwi, J. D., Saah, A. J., Canner, J. K., Dallabetta, G. A., and Hoover, D. R.: Maternal vitamin A deficiency and mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 343: 1593-7, 1994

- Shafer, R. W., Eisen, J. A., Merigan, T. C., and Katzenstein, D. A.: Sequence and drug susceptibility of subtype C reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in Zimbabwe. *Journal of virology* 71: 5441-8, 1997
- Shearer, W. T., Kalish, L. A., and Zimmerman, P. A.: CCR5 HIV-1 vertical transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology* 17: 180-1, 1998
- Shearer, W. T., Quinn, T. C., LaRussa, P., Lew, J. F., Mofenson, L., Almy, S., Rich, K., Handelsman, E., Diaz, C., Pagano, M., Smeriglio, V., and Kalish, L. A.: Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group. *The New England journal of medicine* 336: 1337-42, 1997
- Shimaoka, Y., Hidaka, Y., Tada, H., Nakamura, T., Mitsuda, N., Morimoto, Y., Murata, Y., and Amino, N.: Changes in cytokine production during and after normal pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.)* 44: 143-7, 2000
- Shiver, J. W., Fu, T. M., Chen, L., Casimiro, D. R., Davies, M. E., Evans, R. K., Zhang, Z. Q., Simon, A. J., Trigona, W. L., Dubey, S. A., Huang, L., Harris, V. A., Long, R. S., Liang, X., Handt, L., Schleif, W. A., Zhu, L., Freed, D. C., Persaud, N. V., Guan, L., Punt, K. S., Tang, A., Chen, M., Wilson, K. A., Collins, K. B., Heidecker, G. J., Fernandez, V. R., Perry, H. C., Joyce, J. G., Grimm, K. M., Cook, J. C., Keller, P. M., Kresock, D. S., Mach, H., Troutman, R. D., Isopi, L. A., Williams, D. M., Xu, Z., Bohannon, K. E., Volkin, D. B., Montefiori, D. C., Miura, A., Krivulka, G. R., Lifton, M. A., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Letvin, N. L., Caulfield, M. J., Bett, A. J., Youil, R., Kaslow, D. C., and Emini, E. A.: Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415: 331-5, 2002
- Sicotte, N. L., Liva, S. M., Klutch, R., Pfeiffer, P., Bouvier, S., Odesa, S., Wu, T. C., and Voskuhl, R. R.: Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Annals of neurology* 52: 421-8, 2002
- Sides, T. L., Akinsete, O., Henry, K., Wotton, J. T., Carr, P. W., and Bartkus, J.: HIV-1 subtype diversity in Minnesota. *The Journal of infectious diseases* 192: 37-45, 2005
- Siegal, F. P., Lopez, C., Hammer, G. S., Brown, A. E., Kornfeld, S. J., Gold, J., Hassett, J., Hirschman, S. Z., Cunningham-Rundles, C., Adelsberg, B. R., and et al.: Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *The New England journal of medicine* 305: 1439-44, 1981
- Simon, F., Maucelere, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barre-Sinoussi, F., and Brun-Vezinet, F.: Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine* 4: 1032-7, 1998
- Skrabal, K., Trouplin, V., Labrosse, B., Obry, V., Damond, F., Hance, A. J., Clavel, F., and Mammano, F.: Impact of antiretroviral treatment on the tropism of HIV-1 plasma virus populations. *AIDS (London, England)* 17: 809-14, 2003

- Socie, G., Gluckman, E., Carosella, E., Brossard, Y., Lafon, C., and Brison, O.: Search for maternal cells in human umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of two minisatellite sequences. *Blood* 83: 340-4, 1994
- Soudeyns, H., Campi, G., Rizzardi, G. P., Lenge, C., Demarest, J. F., Tambussi, G., Lazzarin, A., Kaufmann, D., Casorati, G., Corey, L., and Pantaleo, G.: Initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection induces rapid stabilization of the T-cell receptor beta chain repertoire and reduces the level of T-cell oligoclonality. *Blood* 95: 1743-51, 2000
- Soudeyns, H., Paolucci, S., Chappay, C., Daucher, M. B., Graziosi, C., Vaccarezza, M., Cohen, O. J., Fauci, A. S., and Pantaleo, G.: Selective pressure exerted by immunodominant HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses during primary infection drives genetic variation restricted to the cognate epitope. *European journal of immunology* 29: 3629-35, 1999
- Speck, R. F., Wehrly, K., Platt, E. J., Atchison, R. E., Charo, I. F., Kabat, D., Chesebro, B., and Goldsmith, M. A.: Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *Journal of virology* 71: 7136-9, 1997
- Sperling, R. S., Shapiro, D. E., Coombs, R. W., Todd, J. A., Herman, S. A., McSherry, G. D., O'Sullivan, M. J., Van Dyke, R. B., Jimenez, E., Rouzioux, C., Flynn, P. M., and Sullivan, J. L.: Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *The New England journal of medicine* 335: 1621-9, 1996
- Spira, S., Wainberg, M. A., Loemba, H., Turner, D., and Brenner, B. G.: Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51: 229-40, 2003
- Sprecher, S., Soumenkoff, G., Puissant, F., and Degueudre, M.: Vertical transmission of HIV in 15-week fetus. *Lancet* 2: 288-9, 1986
- St Louis, M. E., Kamenga, M., Brown, C., Nelson, A. M., Manzila, T., Batter, V., Behets, F., Kabagabo, U., Ryder, R. W., Oxtoby, M., and et al.: Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic, and placental factors. *Jama* 269: 2853-9, 1993
- Stehr-Green, J. K., Holman, R. C., Jason, J. M., and Evatt, B. L.: Hemophilia-associated AIDS in the United States, 1981 to September 1987. *American journal of public health* 78: 439-42, 1988
- Stiehm, E. R., Lambert, J. S., Mofenson, L. M., Bethel, J., Whitehouse, J., Nugent, R., Moye, J., Jr., Glenn Fowler, M., Mathieson, B. J., Reichelderfer, P., Nemo, G. J., Korelitz, J., Meyer, W. A., 3rd, Sapan, C. V., Jimenez, E., Gandia, J., Scott, G., O'Sullivan, M. J., Kovacs, A., Stek, A., Shearer, W. T., and Hammill, H.: Efficacy of zidovudine and human immunodeficiency virus (HIV) hyperimmune immunoglobulin for reducing perinatal HIV transmission from HIV-infected

- women with advanced disease: results of Pediatric AIDS Clinical Trials Group protocol 185. *The Journal of infectious diseases* 179: 567-75, 1999
- Stoneburner, R. L., Des Jarlais, D. C., Benezra, D., Gorelkin, L., Sotheran, J. L., Friedman, S. R., Schultz, S., Marmor, M., Mildvan, D., and Maslansky, R.: A larger spectrum of severe HIV-1--related disease in intravenous drug users in New York City. *Science* 242: 916-9, 1988
- Stott, E. J.: Anti-cell antibody in macaques. *Nature* 353: 393, 1991
- Stott, E. J., Chan, W. L., Mills, K. H., Page, M., Taffs, F., Cranage, M., Greenaway, P., and Kitchin, P.: Preliminary report: protection of cynomolgus macaques against simian immunodeficiency virus by fixed infected-cell vaccine. *Lancet* 336: 1538-41, 1990
- Stranford, S. A., Skurnick, J., Louria, D., Osmond, D., Chang, S. Y., Sninsky, J., Ferrari, G., Weinhold, K., Lindquist, C., and Levy, J. A.: Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8(+) cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 1030-5, 1999
- Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T., and Martin, M. A.: The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 328: 728-30, 1987
- Sullivan, N., Sun, Y., Sattentau, Q., Thali, M., Wu, D., Denisova, G., Gershoni, J., Robinson, J., Moore, J., and Sodroski, J.: CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *Journal of virology* 72: 4694-703, 1998
- Swanson, P., Soriano, V., Devare, S. G., and Hackett, J., Jr.: Comparative performance of three viral load assays on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates representing group M (subtypes A to G) and group O: LCx HIV RNA quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.5, and Quantiplex HIV-1 RNA version 3.0. *Journal of clinical microbiology* 39: 862-70, 2001
- Taha, T. E., Brown, E. R., Hoffman, I. F., Fawzi, W., Read, J. S., Sinkala, M., Martinson, F. E., Kafulafula, G., Msamanga, G., Emel, L., Adeniyi-Jones, S., and Goldenberg, R.: A phase III clinical trial of antibiotics to reduce chorioamnionitis-related perinatal HIV-1 transmission. *AIDS (London, England)* 20: 1313-21, 2006
- Taha, T. E., Kumwenda, N. I., Hoover, D. R., Fiscus, S. A., Kafulafula, G., Nkhoma, C., Nour, S., Chen, S., Liomba, G., Miotti, P. G., and Broadhead, R. L.: Nevirapine and zidovudine at birth to reduce perinatal transmission of HIV in an African setting: a randomized controlled trial. *Jama* 292: 202-9, 2004
- Takahashi, H., Germain, R. N., Moss, B., and Berzofsky, J. A.: An immunodominant class I-restricted cytotoxic T lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type 1 induces CD4 class II-restricted help for itself. *The Journal of experimental medicine* 171: 571-6, 1990
- Takahashi, H., Nakagawa, Y., Pendleton, C. D., Houghten, R. A., Yokomuro, K., Germain, R. N., and Berzofsky, J. A.: Induction of broadly cross-reactive cytotoxic T cells recognizing an HIV-1 envelope determinant. *Science* 255: 333-6, 1992

- Teixeira, P. R., Vitoria, M. A., and Barcarolo, J.: Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. *AIDS (London, England) 18 Suppl 3*: S5-7, 2004
- Thomson, M. M., Delgado, E., Manjon, N., Ocampo, A., Villahermosa, M. L., Marino, A., H rro, I., Cuevas, M. T., Vazquez-de Parga, E., Perez-Alvarez, L., Medrano, L., Taboada, J. A., and Najera, R.: HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *AIDS (London, England) 15*: 509-16, 2001
- Thomson, M. M., Perez-Alvarez, L., and Najera, R.: Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *The Lancet infectious diseases 2*: 461-71, 2002
- Thomson, S. A., Sherritt, M. A., Medveczky, J., Elliott, S. L., Moss, D. J., Fernando, G. J., Brown, L. E., and Suhrbier, A.: Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 160*: 1717-23, 1998
- Thorne, C. and Newell, M. L.: Epidemiology of HIV infection in the newborn. *Early human development 58*: 1-16, 2000
- Thorne, C., Patel, D., and Newell, M. L.: Increased risk of adverse pregnancy outcomes in HIV-infected women treated with highly active antiretroviral therapy in Europe. *AIDS (London, England) 18*: 2337-9, 2004
- Timmermans, S., Tempelman, C., Godfried, M. H., Nellen, J., Dieleman, J., Sprenger, H., Schneider, M. E., de Wolf, F., Boer, K., and van der Ende, M. E.: Nelfinavir and nevirapine side effects during pregnancy. *AIDS (London, England) 19*: 795-9, 2005
- Tomiyaama, H., Akari, H., Adachi, A., and Takiguchi, M.: Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on human immunodeficiency virus type 1-specific CD8(+) T-cell cytolytic activity and cytokine production. *Journal of virology 76*: 7535-43, 2002
- Torres, G., Garcia, V., Sanchez, E., Segarra, A., Patterson, B. K., and Melendez-Guerrero, L. M.: Expression of the HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 on placental macrophages and the effect of IL-10 on their expression. *Placenta 22 Suppl A*: S29-33, 2001
- Tovanabutra, S., Brodine, S. K., Mascola, J. R., Sankale, J. L., Sanders-Buell, E., Kim, B., Birx, D. L., and McCutchan, F. E.: Characterization of complete HIV type 1 genomes from non-B subtype infections in U.S. military personnel. *AIDS research and human retroviruses 21*: 424-9, 2005
- Townsend, A. and Bodmer, H.: Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annual review of immunology 7*: 601-24, 1989
- Trabattoni, D., Piconi, S., Biasin, M., Rizzardini, G., Migliorino, M., Seminari, E., Boasso, A., Piacentini, L., Villa, M. L., Maserati, R., and Clerici, M.: Granule-dependent mechanisms of lysis are defective in CD8 T cells of HIV-infected, antiretroviral therapy-treated individuals. *AIDS (London, England) 18*: 859-69, 2004
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M. R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R. S., Routy, J. P., Haddad,

- E. K., and Sekaly, R. P.: Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature medicine* 12: 1198-202, 2006
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J. M., Olson, W. C., Allaway, G. P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P. J., and Moore, J. P.: CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384: 184-7, 1996
- Trkola, A., Pomales, A. B., Yuan, H., Korber, B., Maddon, P. J., Allaway, G. P., Katinger, H., Barbas, C. F., 3rd, Burton, D. R., Ho, D. D., and et al.: Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *Journal of virology* 69: 6609-17, 1995
- Tscherning, C., Alaeus, A., Fredriksson, R., Bjorndal, A., Deng, H., Littman, D. R., Fenyö, E. M., and Albert, J.: Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 241: 181-8, 1998
- Tsomides, T. J., Aldovini, A., Johnson, R. P., Walker, B. D., Young, R. A., and Eisen, H. N.: Naturally processed viral peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes on cells chronically infected by human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of experimental medicine* 180: 1283-93, 1994
- Tuomala, R. E., Shapiro, D. E., Mofenson, L. M., Bryson, Y., Culnane, M., Hughes, M. D., O'Sullivan, M. J., Scott, G., Stek, A. M., Wara, D., and Bulterys, M.: Antiretroviral therapy during pregnancy and the risk of an adverse outcome. *The New England journal of medicine* 346: 1863-70, 2002
- Tuomala, R. E., Watts, D. H., Li, D., Vajaranant, M., Pitt, J., Hammill, H., Landesman, S., Zorrilla, C., and Thompson, B.: Improved obstetric outcomes and few maternal toxicities are associated with antiretroviral therapy, including highly active antiretroviral therapy during pregnancy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 38: 449-73, 2005
- Ugen, K. E., Goedert, J. J., Boyer, J., Refaeli, Y., Frank, I., Williams, W. V., Willoughby, A., Landesman, S., Mendez, H., Rubinstein, A., and et al.: Vertical transmission of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Reactivity of maternal sera with glycoprotein 120 and 41 peptides from HIV type 1. *The Journal of clinical investigation* 89: 1923-30, 1992
- Ugen, K. E., Srikantan, V., Goedert, J. J., Nelson, R. P., Jr., Williams, W. V., and Weiner, D. B.: Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1: seroreactivity by maternal antibodies to the carboxy region of the gp41 envelope glycoprotein. *The Journal of infectious diseases* 175: 63-9, 1997
- Unanue, E. R.: Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of Listeria resistance. *Current opinion in immunology* 9: 35-43, 1997
- Van de Perre, P., Simonon, A., Hitimana, D. G., Dabis, F., Msellati, P., Mukamabano, B., Butera, J. B., Van Goethem, C., Karita, E., and Lepage, P.: Infective and anti-infective properties of breastmilk from HIV-1-infected women. *Lancet* 341: 914-8, 1993

- Varmus, H.: Retroviruses. *Science* 240: 1427-35, 1988
- Verhofstede, C., Demecheleer, E., De Cabooter, N., Gaillard, P., Mwanyumba, F., Claeys, P., Chohan, V., Mandaliya, K., Temmerman, M., and 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. *Journal of virology* 77: 3050-7, 2003
- Vidal, N., Peeters, M., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Robertson, D., Ilunga, W., Sema, H., Tshimanga, K., Bongo, B., and Delaporte, E.: Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *Journal of virology* 74: 10498-507, 2000
- Vidricaire, G., Imbeault, M., and Tremblay, M. J.: Endocytic host cell machinery plays a dominant role in intracellular trafficking of incoming human immunodeficiency virus type 1 in human placental trophoblasts. *Journal of virology* 78: 11904-15, 2004
- Vidricaire, G., Tardif, M. R., and Tremblay, M. J.: The low viral production in trophoblastic cells is due to a high endocytic internalization of the human immunodeficiency virus type 1 and can be overcome by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *The Journal of biological chemistry* 278: 15832-41, 2003
- Vodicka, M. A., Koepp, D. M., Silver, P. A., and Emerman, M.: HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes & development* 12: 175-85, 1998
- Vogt, M. W., Witt, D. J., Craven, D. E., Byington, R., Crawford, D. F., Schooley, R. T., and Hirsch, M. S.: Isolation of HTLV-III/LAV from cervical secretions of women at risk for AIDS. *Lancet* 1: 525-7, 1986
- von Schwedler, U., Song, J., Aiken, C., and Trono, D.: Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *Journal of virology* 67: 4945-55, 1993
- Wade, N. A., Zielinski, M. A., Butsashvili, M., McNutt, L. A., Warren, B. L., Glaros, R., Cheku, B., Pulver, W., Pass, K., Fox, K., Novello, A. C., and Birkhead, G. S.: Decline in perinatal HIV transmission in New York State (1997-2000). *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 36: 1075-82, 2004
- Wagner, L., Yang, O. O., Garcia-Zepeda, E. A., Ge, Y., Kalams, S. A., Walker, B. D., Pasternack, M. S., and Luster, A. D.: Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 391: 908-11, 1998
- Watanabe, M., Iwatani, Y., Kaneda, T., Hidaka, Y., Mitsuda, N., Morimoto, Y., and Amino, N.: Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.)* 37: 368-77, 1997

- Watanaveeradej, V., Benenson, M. W., Souza, M. D., Sirisopana, N., Nitayaphan, S., Tontichaivanich, C., Amphapit, R., Renzullo, P. O., Brown, A. E., McNeil, J. G., Robb, M. L., Birx, D. L., Tovanabutra, S., Carr, J. K., and McCutchan, F. E.: Molecular epidemiology of HIV Type 1 in preparation for a Phase III prime-boost vaccine trial in Thailand and a new approach to HIV Type 1 genotyping. *AIDS research and human retroviruses* 22: 801-7, 2006
- Watts, D. H., Balasubramanian, R., Maupin, R. T., Jr., Delke, I., Dorenbaum, A., Fiore, S., Newell, M. L., Delfraissy, J. F., Gelber, R. D., Mofenson, L. M., Culnane, M., and Cunningham, C. K.: Maternal toxicity and pregnancy complications in human immunodeficiency virus-infected women receiving antiretroviral therapy: PACTG 316. *American journal of obstetrics and gynecology* 190: 506-16, 2004
- Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., and Mosmann, T. R.: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today* 14: 353-6, 1993
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D., and Shaw, G. M.: Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422: 307-12, 2003
- Weidle, P. J., Ganea, C. E., Irwin, K. L., Pieniazek, D., McGowan, J. P., Olivo, N., Ramos, A., Schable, C., Lal, R. B., Holmberg, S. D., and Ernst, J. A.: Presence of human immunodeficiency virus (HIV) type 1, group M, non-B subtypes, Bronx, New York: a sentinel site for monitoring HIV genetic diversity in the United States. *The Journal of infectious diseases* 181: 470-5, 2000
- Welles, S. L., Pitt, J., Colgrove, R., McIntosh, K., Chung, P. H., Colson, A., Lockman, S., Fowler, M. G., Hanson, C., Landesman, S., Moye, J., Rich, K. C., Zorrilla, C., and Japour, A. J.: HIV-1 genotypic zidovudine drug resistance and the risk of maternal-infant transmission in the women and infants transmission study. The Women and Infants Transmission Study Group. *AIDS (London, England)* 14: 263-71, 2000
- Wilder, R. L.: Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 840: 45-50, 1998
- Wilson, C. C., Brown, R. C., Korber, B. T., Wilkes, B. M., Ruhl, D. J., Sakamoto, D., Kunstman, K., Luzuriaga, K., Hanson, I. C., Widmayer, S. M., Wiznia, A., Clapp, S., Ammann, A. J., Koup, R. A., Wolinsky, S. M., and Walker, B. D.: Frequent detection of escape from cytotoxic T-lymphocyte recognition in perinatal human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transmission: the ariel project for the prevention of transmission of HIV from mother to infant. *Journal of virology* 73: 3975-85, 1999
- Winchester, R., Chen, Y., Rose, S., Selby, J., and Borkowsky, W.: Major histocompatibility complex class II DR alleles DRB1*1501 and those encoding HLA-DR13 are preferentially associated with a diminution in maternally transmitted human immunodeficiency virus 1 infection in different ethnic groups: determination by an

- automated sequence-based typing method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 12374-8, 1995
- Wright, P. F., Lambert, J. S., Gorse, G. J., Hsieh, R. H., McElrath, M. J., Weinhold, K., Wara, D. W., Anderson, E. L., Keefer, M. C., Jackson, S., Wagner, L. J., Francis, D. P., Fast, P. E., and McNamara, J.: Immunization with envelope MN rgp120 vaccine in human immunodeficiency virus-infected pregnant women. *The Journal of infectious diseases* 180: 1080-8, 1999
- Wu, X., Parast, A. B., Richardson, B. A., Nduati, R., John-Stewart, G., Mbori-Ngacha, D., Rainwater, S. M., and Overbaugh, J.: Neutralization escape variants of human immunodeficiency virus type 1 are transmitted from mother to infant. *Journal of virology* 80: 835-44, 2006
- Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A., and Sodroski, J. G.: The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393: 705-11, 1998
- Xu, X. N., Sreaton, G. R., Gotch, F. M., Dong, T., Tan, R., Almond, N., Walker, B., Stebbings, R., Kent, K., Nagata, S., Stott, J. E., and McMichael, A. J.: Evasion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by nef-dependent induction of Fas ligand (CD95L) expression on simian immunodeficiency virus-infected cells. *The Journal of experimental medicine* 186: 7-16, 1997
- Yamaguchi, J., Coffey, R., Vallari, A., Ngansop, C., Mbanya, D., Ndembi, N., Kaptue, L., Gurtler, L. G., Bodelle, P., Schochetman, G., Devare, S. G., and Brennan, C. A.: Identification of HIV type 1 group N infections in a husband and wife in Cameroon: viral genome sequences provide evidence for horizontal transmission. *AIDS research and human retroviruses* 22: 83-92, 2006
- Yang, O. O., Sarkis, P. T., Trocha, A., Kalams, S. A., Johnson, R. P., and Walker, B. D.: Impacts of avidity and specificity on the antiviral efficiency of HIV-1-specific CTL. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 171: 3718-24, 2003
- Yerly, S., Jost, S., Monnat, M., Telenti, A., Cavassini, M., Chave, J. P., Kaiser, L., Burgisser, P., and Perrin, L.: HIV-1 co/super-infection in intravenous drug users. *AIDS (London, England)* 18: 1413-21, 2004
- Yu, Z., Karem, K. L., Kanangat, S., Manickan, E., and Rouse, B. T.: Protection by minigenes: a novel approach of DNA vaccines. *Vaccine* 16: 1660-7, 1998
- Yusim, K., Kesmir, C., Gaschen, B., Addo, M. M., Altfeld, M., Brunak, S., Chigaev, A., Detours, V., and Korber, B. T.: Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation. *Journal of virology* 76: 8757-68, 2002
- Zapp, M. L. and Green, M. R.: Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* 342: 714-6, 1989
- Zhang, Y. J. and Moore, J. P.: Will multiple coreceptors need to be targeted by inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry? *Journal of virology* 73: 3443-8, 1999

- Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A., and Roux, K. H.: Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15812-7, 2003
- Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A., and Roux, K. H.: Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441: 847-52, 2006
- Zhu, T., Wang, N., Carr, A., Wolinsky, S., and Ho, D. D.: Evidence for coinfection by multiple strains of human immunodeficiency virus type 1 subtype B in an acute seroconverter. *Journal of virology* 69: 1324-7, 1995
- Zhuang, J., Jetzt, A. E., Sun, G., Yu, H., Klarmann, G., Ron, Y., Preston, B. D., and Dougherty, J. P.: Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *Journal of virology* 76: 11273-82, 2002
- Zuckermann, F. A. and Head, J. R.: Possible mechanism of non-rejection of the fetal-placental allograft: trophoblast resistance to lysis by cellular immune effectors. *Transplantation proceedings* 19: 554-6, 1987