

ACADEMIE DE MONTPELLIER  
UNIVERSITE MONTPELLIER II  
- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC -

# THESE

présentée à l'université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITÉ : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé  
Formation doctorale : Biologie Santé

**ETUDE DES CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES  
ET VIROLOGIQUES DE L'INFECTION A VIH-1  
SURVENUE OUTRE-MER**

par

**Mariama LASKY**

Soutenue le 16/12/96 devant le Jury composé de :

P. BOULANGER	Professeur, Montpellier I	Examineur
E. DELAPORTE	Directeur de Recherche INSERM, Montpellier	Examineur
B. LEBLEU	Professeur, Montpellier II	Examineur
S. MBOUP	Professeur, Faculté de Médecine Dakar	Rapporteur
S. SARAGOSTI	Directeur de Recherche, INSERM, Paris	Rapporteur
G. CUNY	Directeur de Recherche, ORSTOM Montpellier	Directeur de thèse

**En hommage aux personnes vivant avec le VIH**

**A la mémoire de mes grands parents**

A mes parents,  
pour l'équilibre et le soutien que vous avez su me donner.  
Qu' ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amour

A Ibrahim  
Avec toute mon affection

A Karima, Silma, Adil et Hicham  
avec toute ma tendresse

A Corinne et Khalil  
avec toute ma tendresse

## AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé, de Décembre 1994 au mois de septembre 1996 au sein du laboratoire Rétrovirus, Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération (ORSTOM), Centre de Montpellier, grâce au soutien financier de l'Agence National de la Recherche sur le SIDA (ANRS).

Je voudrais commencer en exprimant ma profonde gratitude au Docteur Eric Delaporte qui m'a confié ce travail. Ensuite, Martine Peeters, dont le rôle fut déterminant pour l'aboutissement de ce travail.

Je suis également très honorée par la présence dans mon jury de messieurs Pierre BOULANGER et Bernard LEBLEU. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Messieurs Souleymane MBOUP et Sentob SARAGOSTI, pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail en acceptant de le juger.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers Gérard CUNY qui ma fait découvrir, apprécier, et aimer la biologie moléculaire, me permettant, aujourd'hui, de présenter ce travail. Je lui témoigne mon plus profond respect.

Je tiens à remercier Sophie RAVEL pour m'avoir initié à la recherche et pour sa disponibilité tout au long de ces quatre années.

Je tiens à remercier également Frédéric BIBOLLET-RUCHE pour ses conseils et son aide au cours de ce travail.

Que Monsieur et Madame TROUSLOT trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour leur disponibilité et leur sympathie.

J'adresse toute mon amitié à Claire NGUYEN et Valérie DUMAS pour leur présence dans les moments difficiles.

Mes remerciements s'adressent à tous les membres du laboratoire : Claire, Cécile, Véronique, Nicole, Pascale, Pascal, Delphine, Florian, Caroline, Nâardifa, Frédérique, Delphine, Euloge, Francisco et tous les autres collègues, étudiants, chercheurs, agents du personnel administratif de l'ORSTOM que je ne nomme pas, mais qui ont su donner au moment voulu un peu de leurs temps et de leur personne pour m'aider et me conseiller.

# Sommaire

---

<b>Introduction</b> .....	5
<b>I Le Virus de l'Immunodéficience Humaine</b> .....	5
I.1 Généralités .....	5
I.1.1 Historique du VIH.....	5
I.1.2 Classification des rétrovirus.....	7
I.2 Structure de la particule virale du VIH.....	8
I.2.1 Organisation génétique du virus VIH-1 .....	10
I.2.1.1 Les gènes de structure .....	11
I.2.1.2 Région promotrice.....	14
I.2.1.3 Gènes accessoires.....	14
I.2.2 Organisation génétique du virus VIH-2 .....	17
I.3 Cycle de réplication du VIH .....	17
I.3.1 L'adsorption et la fusion .....	18
I.3.2 La rétrotranscription .....	20
I.3.3 Intégration.....	21
I.3.3 Transcription .....	23
I.3.5 Maturation virale et bourgeonnement.....	24
<b>II Pathogénèse de l'infection par VIH-1</b> .....	27
II.1 Primo-infection .....	27
II.3 Latence et évolution de l'infection .....	30
II.4 Immunopathogénèse.....	32
II.6 Pathogénèse de l'infection à VIH-2.....	34
II.7 Conclusion.....	35

III.Variabilité du VIH.....	36
III.1 Variabilité génétique du VIH.....	36
III.1.1 L'origine de la variabilité .....	36
III.1.2 Diversité génétique du VIH-1.....	37
III.1.2.1 les sous-types du groupe M.....	37
III.1.2.3 Mise en évidence d'un nouveau type de VIH-1 groupe O.....	39
III.1.3 Les différents sous-types du VIH-2.....	42
III.1.4 Evolution de la variabilité intrapatient du VIH-1 lors de l'infection par le VIH-1 (quasi-espèces).....	43
III.1.5 Variabilité intrapatient du VIH-1 dans différents organes.....	44
III.1.6 Recombinaison génétique chez le VIH-1 les génomes mosaïques.....	46
III.2 Variabilité biologique.....	51
III.2.1 Tropisme du VIH.....	51
III.2.2 Notion de souches "rapid/high" et "slow/low" .....	53
III.2.2.1 Transition NSI->SI au cours de l'infection? .....	55
III.3 Variabilité antigénique.....	56
III.4 Signification de la variabilité .....	57
III.4.1 Variabilité et pathogénèse.....	58
III.4.3 Variabilité et diagnostic .....	59
III.4.4 Variabilité et épidémiologie .....	59
IV Epidémiologie de l'infection à VIH.....	61
IV.1 Mode de transmission.....	61
IV.2 Epidémiologie générale .....	62
V. Les virus de l'immunodéficience simienne.....	67
VI Classification des lentivirus de primates.....	68
VII Origine du VIH.....	69
<b>Présentation du travail.....</b>	<b>73</b>
<b>Partie I :Etude des caractéristiques moléculaires de l'infection à VIH-1 survenue Outre-mer.....</b>	<b>76</b>
I L'objectif	
II Population étudiée et méthodes	
III Résultats .....	77
VI Conclusion .....	78

<b>Publication.....</b>	<b>79</b>
<b>Partie II :Etude du phénotype biologique du VIH-1 .....</b>	<b>104</b>
<b>I Introduction.....</b>	<b>104</b>
<b>II Matériels et méthodes.....</b>	<b>107</b>
II.1 Patients .....	107
II.2 Isolement viral .....	108
II.3 Caractérisation des phénotypes biologiques.....	108
II.4 PCR et séquençage.....	109
II.5 L'analyse des séquences protéique de la boucle V3.....	110
II.6 Numération des lymphocytes CD4+.....	110
<b>III Résultats .....</b>	<b>111</b>
III.1 Prévalence des virus SI dans la population étudiée .....	111
III.2 Prévalence des virus SI en fonction du nombre des lymphocytes CD4+ et de la durée d'infection.....	111
III.3 Corrélation entre la capacité d'induire des syncytia et la charge des acides aminés de la boucle V3.....	114
<b>VI Discussion.....</b>	<b>115</b>
<b>VII Références bibliographiques.....</b>	<b>123</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>127</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>133</b>

# Introduction

---

Cette première partie est composée d'un rappel bibliographique des principales caractéristiques des lentivirus humains, de leurs propriétés génétiques et biologiques, et de l'épidémiologie de l'infection dans le monde.

## I Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

### I.1 Généralités

#### I.1.1 Historique du VIH

Deux années après la description des premiers cas du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) en 1981, Barré-Sinoussi et collaborateurs isolaient un rétrovirus à partir d'un prélèvement ganglionnaire effectué chez un patient présentant une lymphadénopathie persistante. Ce virus fut appelé LAV pour "Lymphadenopathy Associated Virus" (Barré-Sinoussi et coll., 1983). Durant cette même période, d'autres équipes isolaient, à partir de lymphocytes de patients présentant un SIDA ou des pathologies associées (ARC pour "AIDS Related Complex"), d'autres rétrovirus qui furent appelés HTLV III pour "Human T-Lymphotropic Virus Type III" (Gallo et coll., 1984) et

ARV pour "AIDS Related Virus" (Levy et coll., 1984). Ces différents virus présentaient "in vitro" des propriétés identiques, telles qu'un tropisme exclusif pour les cellules CD4<sup>+</sup> (Klatzman et coll., 1984) et la capacité à détruire ces cellules. Ces éléments permettaient d'interpréter un phénomène clef de la physiopathologie du SIDA: une déplétion progressive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques chez les patients.

L'analyse génétique de ces différents isolats a permis de montrer qu'il s'agissait de trois variants d'un même virus (Alizon et coll., 1984; Luciw et coll., 1984; Muesing et coll., 1985; Wain Hobson et coll., 1985). L'appellation VIH pour "Virus de l'Immunodéficience Humaine" fût adoptée pour classer ces trois isolats viraux (Coffin et coll., 1986).

La mise en évidence de sérologies atypiques chez des habitants de Guinée Bissau et d'autres pays d'Afrique de l'Ouest fit soupçonner l'existence d'un second virus du SIDA. Dans un premier temps, furent rapportés des cas de personnes asymptomatiques présentant des anticorps dirigés contre la protéine de capsid mais sans anticorps détectable contre les protéines d'enveloppe des virus VIH (Barin et coll., 1985). En 1986, Clavel et collaborateurs isolèrent à partir de patients au stade SIDA un rétrovirus morphologiquement semblable au VIH, et partageant le même tropisme pour les cellules CD4<sup>+</sup> (Clavel et coll., 1986). Ce nouveau virus, représentant un sérotype distinct, fût nommé VIH-2, et le prototype du SIDA fût rebaptisé VIH-1. L'analyse génétique montra que ce virus possédait une organisation génétique similaire à celle du VIH-1, avec toutefois une forte divergence, d'environ 50%, dans les séquences nucléotidiques. La séquence génomique du VIH-2 est homologue à 80 % au virus simien du macaque, SIVmac (Clavel et coll., 1986).

### I.1.2 Classification des rétrovirus

Au sein de la famille des virus à ARN, les rétrovirus sont le groupe le plus diversifié au regard de l'organisation et de la plasticité de leur génome. Ils possèdent la capacité de convertir l'ARN génomique viral en un ADN double brin qui peut s'intégrer au génome de la cellule hôte (Baltimore, 1970). Cette conversion de l'ARN en ADN nécessite la présence de la transcriptase inverse avec ses deux activités enzymatiques : activité ADN polymérase ARN dépendante et activité ribonucléase H (dégradation de l'ARN du duplex ARN-ADN) (pour revue, Teich, 1985). Les rétrovirus peuvent être classifiés selon leur origine; on distingue les rétrovirus endogènes et exogènes.

Les rétrovirus endogènes sont transmis par les lignées germinales. Leurs caractéristiques ne sont que la conséquence de leur existence dans les lignées germinales : ces virus ne s'expriment pas, sont défectifs pour la production de particules infectieuses, et sont donc non pathogènes. Leur non-infectiosité est due à des mutations ponctuelles ou à des délétions d'une partie de leur génome. Ils proviennent probablement de rétrovirus exogènes ayant infectés des lignées germinales (Todaro, 1975; Coffin, 1984).

Selon la structure de la particule virale, les altérations cellulaires induites "in vitro" et la pathologie induite "in vivo", les rétrovirus exogènes sont subdivisés en trois sous-familles (Teich, 1985) :

- **Les Spumavirus** : ils ne sont actuellement associés à aucune pathologie humaine ou animale. Ils induisent des vacuolisations des cellules "in vitro".

- **Les Oncovirus**, sont caractérisés par leur pouvoir oncogène avec transformation des cellules infectées. Ils induisent des tumeurs soit en exprimant les oncogènes qu'ils portent, soit en activant des proto-oncogènes, soit en transactivant des gènes cellulaires. Ils sont responsables de leucémies,

de lymphomes et de sarcomes. L'HTLV I (pour Human T-cell Leukemia virus type I) est le premier oncovirus humain mis en évidence (Poiesz et coll., 1980).

- **Les Lentivirus** : ils induisent des pathologies non néoplasiques inflammatoires à évolution lente, et sont généralement cytopathogènes "in vitro" (pour revue, Narayan et Clements, 1989). La caractéristique majeure des lentivirus est d'établir une infection persistante dans l'organisme malgré la réponse du système immunitaire et de parvenir à dérégler progressivement le fonctionnement de celui-ci. Les virus de l'immunodéficience humaine appartiennent à cette famille.

Une nouvelle classification de ces virus exogènes a été récemment établie (Coffin, 1992), sur la base de leurs caractéristiques moléculaires et est présentée dans le Tableau 1.

## **I.2 Structure de la particule virale du VIH**

La microscopie électronique du virus révèle une forme sphérique de 100 à 140 nm de diamètre (Figure 1). Le VIH possède une capsidie protéique et une enveloppe externe partiellement dérivée de la membrane cellulaire contenant les glycoprotéines gp120 et gp41.

Son génome se compose de deux brins d'ARN identiques associés aux trois enzymes virales: l'intégrase, la protéase et la transcriptase inverse. Ces trois enzymes confèrent au virus la particularité de se répliquer dans la cellule hôte via un intermédiaire à ADN bicaténaire. La forme ADN du génome viral s'intègre dans le chromosome de la cellule infectée sous forme de provirus, qui sera transcrit et répliqué au même titre qu'un gène cellulaire.

Sous famille	Genre		Exemples
	Ancienne taxonomie	Nouvelle taxonomie	
<b>Oncovirinae</b>	oncovirus de type C (MLV, FeLV, HTLV..)	virus de type MLV	MLV, FeLV, GALV...
	oncovirus de type B	virus de type B	MMTV
	oncovirus de type D	virus de type D	MPMV, SMRV
		virus de type ALV HTLV-BLV	ALV, RSV HTLV I et II, BLV
<b>Lentivirinae</b>	lentivirus	lentivirus ovin et caprins	Visna, CAEV
		lentivirus équin	EIAV
		lentivirus de primates	HIV, SIV
		lentivirus félin	FIV
		lentivirus bovin	BIV
<b>Spumavirinae</b>	spumavirus	spumavirus	HSRV, SFV

Tableau 1 : Ancienne et nouvelle classification des rétrovirus exogènes  
(d'après Coffin, 1992).

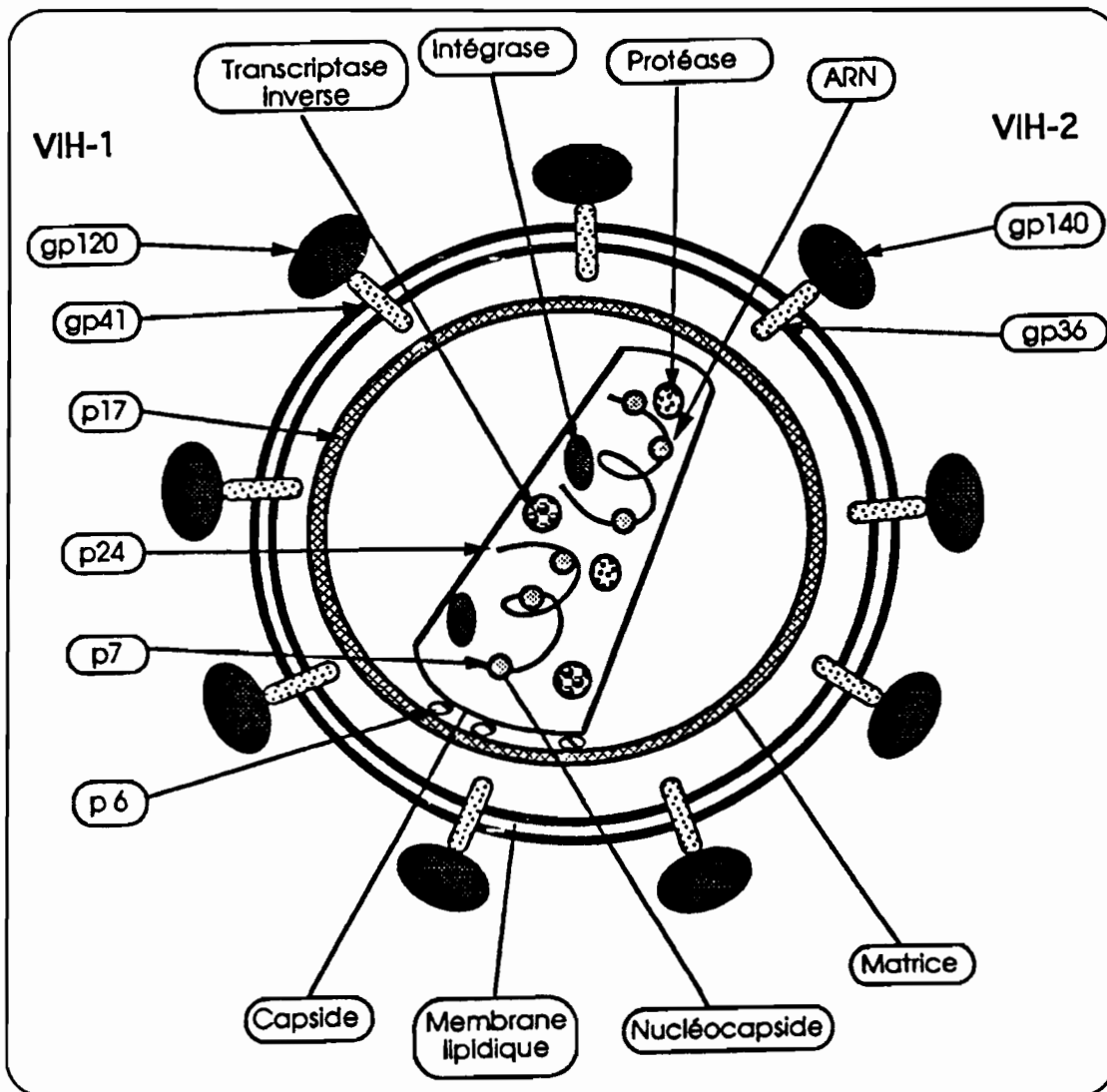


Figure 1 : Représentation schématique de la structure de la particule virale du VIH-1 et du VIH-2

### I.2.1 Organisation génétique du virus VIH-1

Comme tous les rétrovirus, le VIH-1 possède trois gènes codant pour des protéines de structure ( gag, pol et env), encadrés par deux longues séquences répétées (LTR pour "Long Terminal Repeat") nécessaires à l'expression des gènes viraux. De plus, le VIH possède six autres phases ouvertes de lecture (ORF pour "Open Reading Frame") codant pour des protéines de régulation (vpr, vif, vpu, tat, rev, nef) (Figure 2).

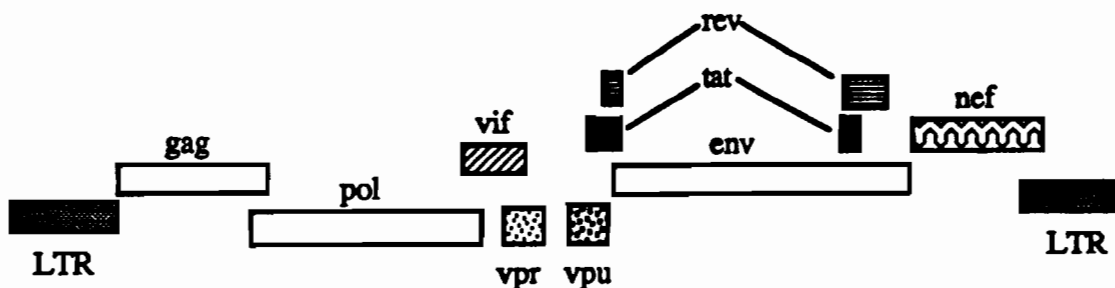


Figure 2 : Représentation schématique du génome du VIH-1.

### 1.2.1.1 Les gènes de structure

Le gène gag pour "Group Antigen" code pour un ARN messager qui est traduit sous la forme d'un précurseur de 55Kd. Ce précurseur sera ultérieurement clivé par la protéase virale pour engendrer les protéines matures: protéine de la matrice (MA p17), de la capsid (CA p24), et de la nucléocapsid (NC p15) (Gelderblom et col., 1991). (Figure 3)

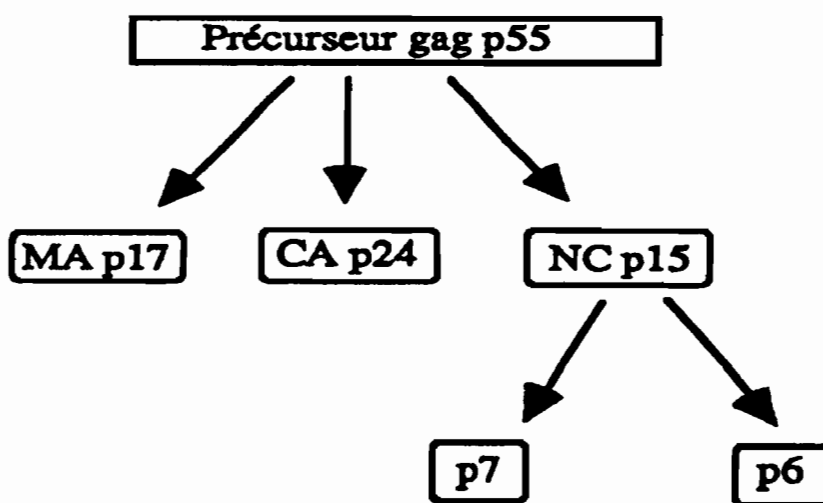


Figure 3 : Protéines résultant de la maturation post traductionnelle du précurseur gag p55.

- La protéine p17 est localisée sur la face interne de l'enveloppe virale grâce à une glycine myristilée (Figure 1). Cette myristilation est primordiale dans le bourgeonnement de la particule virale (Göttlinger et coll., 1989).

- La protéine p24 constitue le "core" cylindrique de la capside virale.

- La protéine p15 est une protéine basique possédant deux motifs "Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys" appelés "doigt de zinc". Ce motif confère à la protéine les capacités d'interagir avec les acides nucléiques (Morellet et coll., 1992). La p15 sera maturée par la protéase virale en p7 et p6.

Le gène *env* code pour les protéines de l'enveloppe virale, produites sous forme d'un précurseur de 160Kd. La maturation post-traductionnelle de ce précurseur comporte de nombreuses étapes ( pour revue, McKeating et coll., 1989). Ces étapes donnent naissance à deux glycoprotéines, la gp120 et la gp41 (Figure 4) :

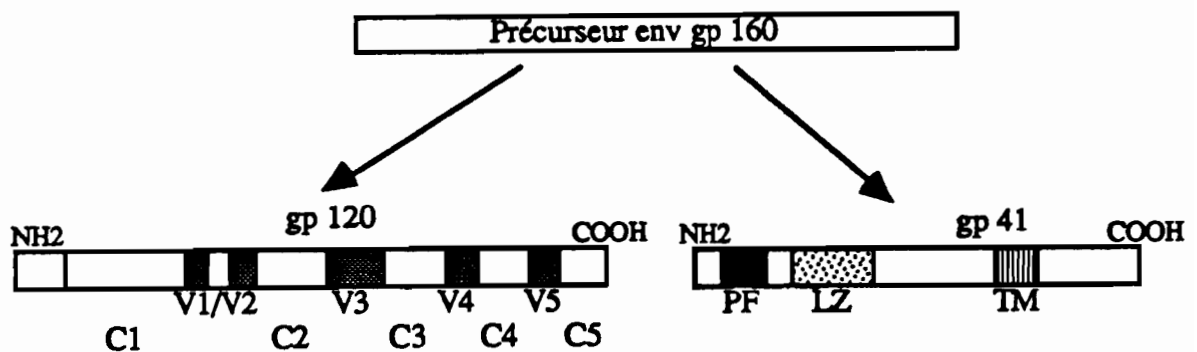


Figure 4 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe gp120 (les régions variables (V) et constantes (C) sont indiquées) et gp41 du VIH-1.

- La glycoprotéine gp120 est une protéine extra-membranaire de 480 aa. fortement glycosylée. La comparaison des séquences protéiques de la gp120 de différents isolats de VIH-1 et de VIH-2 a montré une alternance de régions conservées, variables et hypervariables (Figure 4).

- La glycoprotéine trans-membranaire gp41 est une protéine de 330 aa, subdivisée en trois domaines fonctionnels (Figure 4) : la région trans-membranaire est constituée par le domaine d'ancrage à la bicouche lipidique et le domaine cytoplasmique C-terminal. La région externe est constituée du domaine fusogène (PF pour "Peptide Fusion") en N-terminal et le domaine d'interaction avec la gp120 (LZ pour "Leucine Zipper") (Levy, 1993).

Le gène **pol** code pour trois enzymes virales impliquées dans plusieurs étapes du cycle viral : la protéase (PR p12), la transcriptase inverse (RT p66) et l'intégrase (IN p32) (Figure 5):

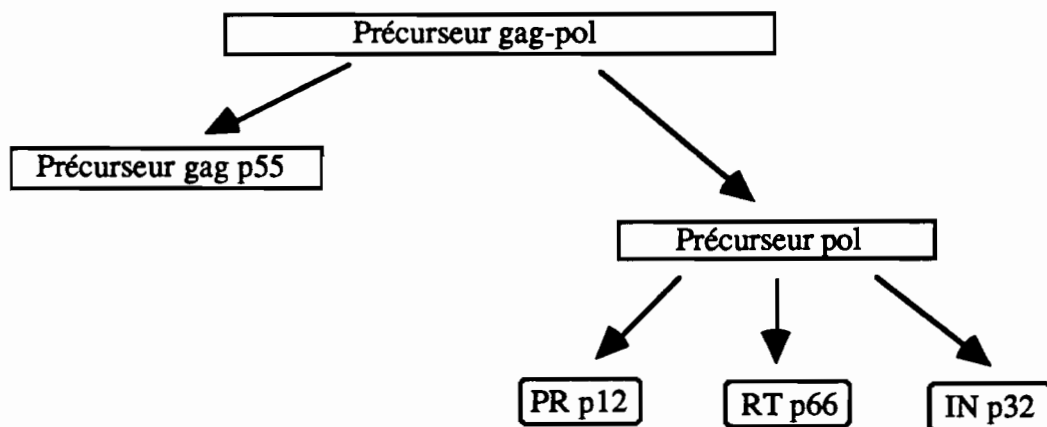


Figure 5: Protéines résultant de la maturation post traductionnelle du précurseur pol

- La protéase permet la maturation des protéines codées par les gènes gag et pol.

- La transcriptase inverse est une ADN polymérase ARN/ADN dépendante, associée à une activité RNase H (Baber et coll., 1990).

- L'intégrase permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte (Martin, 1993).

### ***1.2.1.2 Région promotrice***

Les LTR (pour "Long Terminal Repeat") sont formés au moment de la rétrotranscription de l'ARN viral (Figure 8). Le LTR situé en 5' du génome contient les éléments nécessaires pour l'initiation et la régulation de l'expression des gènes viraux. Le LTR situé en 3' contient les éléments de terminaison et de polyadénylation pour les ARN messagers (pour revue, Garcia et Gaynor, 1994)

### ***1.2.1.3 Gènes accessoires***

Les gènes accessoires impliqués dans la régulation sont très importants dans le déroulement du cycle de réplication du VIH ainsi que dans la physiopathologie de l'infection.

- Le gène vif (pour "Virion Infectivity Factor") code pour une protéine de 23kD essentielle au pouvoir infectieux des particules virales (Fischer et coll., 1987; Strebel et coll., 1987). Cette protéine est présente dans le cytoplasme soit sous forme soluble dans le cytosol (Lee et coll., 1986) soit associée à la face interne de la membrane cytoplasmique (Gonclaves et coll., 1994). La protéine Vif est responsable de l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans la particule virale (Guy et coll., 1991). Son importance pour la production de particules virales infectieuses dépend du type de cellules infectées, suggérant qu'elle remplacerait certains facteurs d'origine cellulaire pour l'assemblage des différentes protéines présentes dans les virions (Gabuzda et coll., 1992; Blanc et coll., 1993; Sakai et coll., 1993). Von Schwedler et collaborateurs ont montré que la protéine Vif était nécessaire pour la synthèse d'ADN proviral (Von Schwedler et coll., 1993). Cette protéine intervient également dans une étape précédant l'intégration (Raghavendar et coll., 1995).

- Le gène *vpu* code pour une phosphoprotéine associée à la membrane cellulaire (Cohen et coll., 1988; Strebel et coll., 1989; Schubert et coll., 1992). La protéine Vpu intervient dans le bourgeonnement et la libération des virions (Terwilliger et coll., 1989; Klimket et coll., 1990). Elle induit aussi la dégradation de la molécule CD4 en interagissant avec la partie cytoplasmique de cette protéine cellulaire (Chen et coll., 1993; Vincent et coll., 1993; Willey et coll., 1994; Bour et coll., 1995). Cette dégradation de la molécule CD4 permet la libération de la gp160 et sa maturation (Willey et coll., 1992a; Willey et coll., 1992b).

- Le gène *vpr* code pour une protéine retrouvée dans les virions, dans des quantités équivalentes aux protéines Gag (Cohen et coll., 1990), propriété inhabituelle pour une protéine de régulation. L'étude des virus mutants ou défectifs pour *vpr* montre une cinétique de réplication plus lente dans les lymphocytes (Ogawa et coll., 1989) et une réplication faible dans les monocytes (Hattori et coll., 1990). Les rôles de cette protéine ne sont pas clairement établis : on la retrouve associée à la protéine p6 de gag (Kondo et coll., 1995), au complexe de préintégration (Zhao et coll., 1994) et elle pourrait jouer un rôle dans la transcription des gènes du VIH (Cohen et coll., 1990). Elle pourrait également intervenir dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire, rendant les cellules plus permissives à la réplication du virus (Levy et coll., 1993). La présence de protéine Vpr dans le sérum des patients infectés par le VIH (Levy et coll., 1994), ainsi que la propriété de réactiver la production de virus pour les lignées cellulaires infectées de façon latente (Levy et coll., 1995), indiquent que cette protéine jouerait un rôle important dans l'évolution de l'infection.

- Le gène *tat* code pour une protéine de 15 kD essentielle à l'expression des gènes viraux (Sodroski et coll., 1985). La protéine Tat régule de façon positive le

taux des ARNm et le niveau de production du virus. De plus Tat pourrait avoir un rôle direct dans le pouvoir pathogène du VIH. Elle peut modifier la transcription de certains gènes cellulaires entraînant la tumorigénèse des cellules ou la modification de la réponse aux stimuli cellulaires (Subramanyam et coll., 1993). Enfin, la protéine Tat extracellulaire est capable d'induire l'apoptose des lymphocytes CD4<sup>+</sup> non infectés. Cette propriété pourrait être directement liée au développement de l'immunodéficience lors de l'infection par le VIH (Li et coll., 1995). Récemment, Nath et collaborateurs (1996) ont identifié un épitope de la protéine Tat responsable du mécanisme induisant une neurotoxicité. L'expression des ARNm de Tat dans les ganglions lymphatiques et les PBLs des patients infectés suggère un rôle potentiel de Tat dans la suppression immunitaire "in vivo" et spécialement durant la phase aiguë de la maladie.

- Le gène rev code pour une protéine de 20 kD indispensable à l'expression des gènes codant pour les protéines de structure du VIH (Gag, Pol, et Env) (Sodrosky et coll., 1986). La protéine Rev agit en effectuant le transport des ARN non-épissés ou mono-épissés du noyau vers le cytoplasme, permettant ainsi leur traduction (Emerman et coll., 1989; Malin et coll., 1990; Felberg et coll., 1989). Elle pourrait également contribuer au tropisme cellulaire du VIH-1 (pour revue, Dayton et coll., 1993).

- Le gène nef (pour "negative factor") code pour une protéine de 27 kD. La protéine a été initialement décrite comme un gène de latence, régulant négativement la réplication virale par répression transcriptionnelle au niveau du LTR (Ahmad et Vankatesan, 1988; Cheng-Mayer et coll., 1989; Niederman et coll., 1989) mais ces résultats ont été controversés (Hammes et coll., 1989; Kim et coll., 1989). Des études ont montré un effet positif de nef sur la transcription des gènes viraux (De Ronde et coll., 1992; Zazopoulos et coll., 1993; Miller et

coll., 1994). Récemment, d'autres résultats ont confirmé un rôle important de Nef dans la pathogénicité et l'infectivité du VIH-1 (Jamieson et coll., 1994; Chowers et coll., 1994). Un autre rôle controversé de la protéine Nef est son activité GTPase (Guy et coll., 1987), qui a été infirmé par d'autres études (Kaminchick et coll., 1990; Mastura et coll., 1991; Nebreda et coll., 1991). Enfin, la régulation négative de l'expression du récepteur CD4 "in vivo" et "in vitro" est un des rôles reconnu de Nef (Garcia et Miller, 1991; Mariani et Skowronski, 1993; Skowronski et coll., 1993).

### I.2.2 Organisation génétique du virus VIH-2

Le VIH-2 possède une organisation génétique similaire au VIH-1, à la différence près que le gène *vpu* est absent et que l'on retrouve un autre gène, *vpx* (Figure 6). La structure de la particule virale ainsi que les masses moléculaires apparentes des différentes protéines de l'enveloppe sont indiquées sur la figure 1.

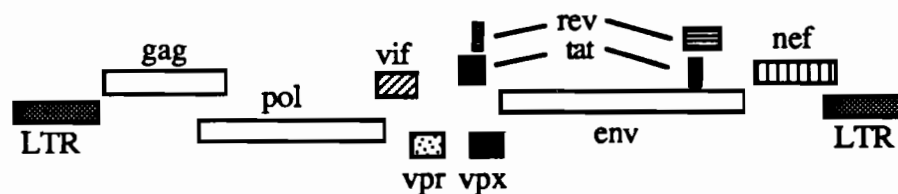


Figure 6: Représentation schématique du génome du VIH-2.

### I.3 Cycle de réplication du VIH

Les différentes étapes sont schématisées dans la figure 7.

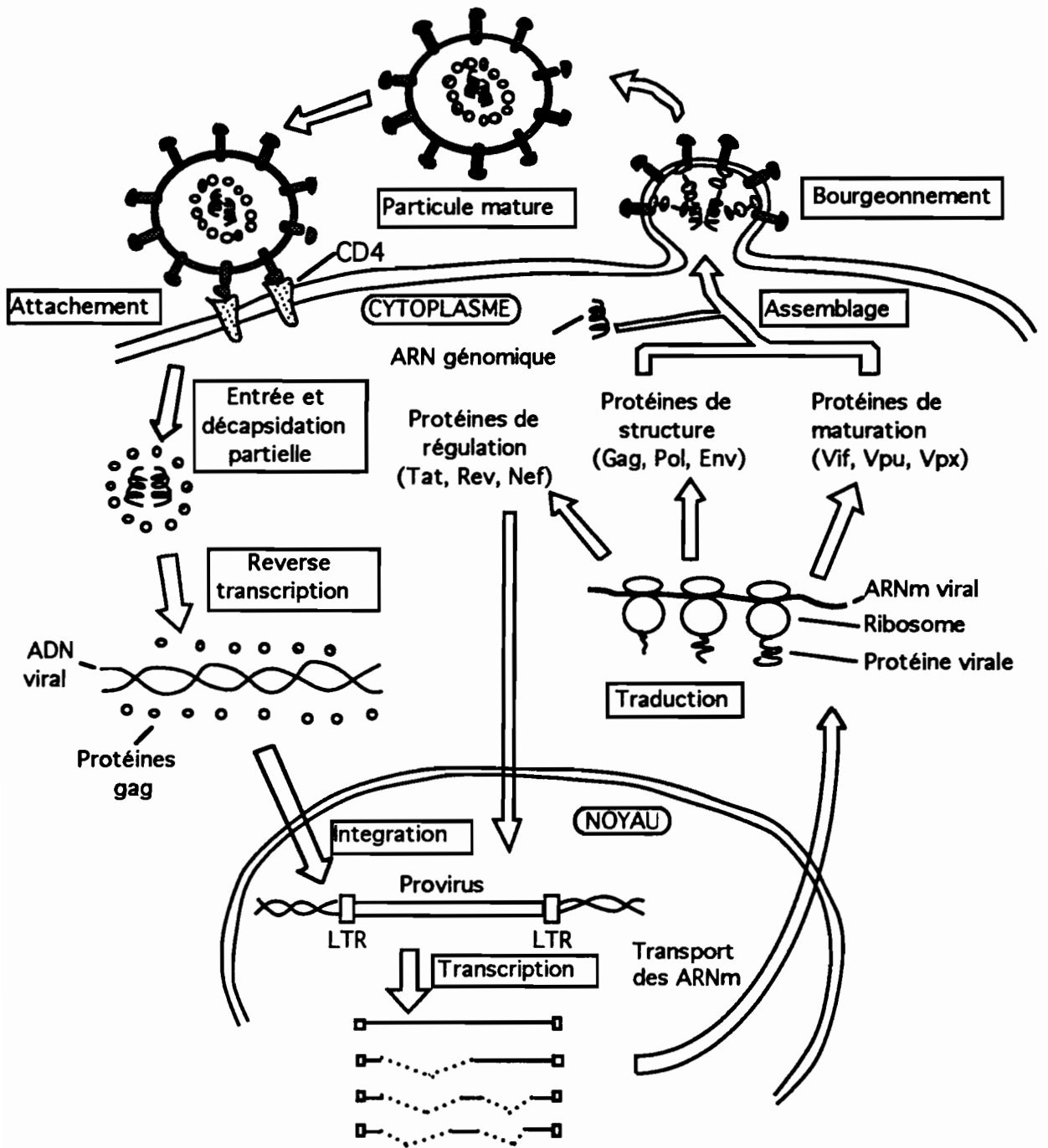


Figure 7 : Représentation schématique du cycle viral du VIH.

### I.3.1 L'adsorption et la fusion

La première étape du cycle de réplication est l'adsorption du virus sur la cellule cible. Cette étape est initiée par l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et la molécule CD4 présente à la surface des cellules cibles. L'identification de ce récepteur a été rendue possible par la mise en évidence du tropisme du virus pour les lymphocytes CD4<sup>+</sup> (Klatzman et coll., 1984), par l'inhibition de l'infectivité du VIH à l'aide d'anticorps dirigés contre le récepteur CD4 (Dalgleish et coll., 1984). Le contact direct entre ces deux protéines fut démontré par des expériences de copréciptation des deux molécules à partir de lysat de cellules infectées (McDougal et coll., 1986). Enfin, Maddon et collaborateurs montrèrent en 1986 que l'expression du récepteur CD4 par des cellules initialement CD4<sup>-</sup> rendait ces cellules permissives à l'infection.

L'interaction avec la gp120 fait intervenir les acides aminés 43 à 59 du domaine CDR2 de la région V1 de la molécule CD4 (Clayton et coll., 1988; Arthos et coll., 1989; Clayton et coll., 1989). Lifson et collaborateurs ont également montré le rôle du domaine CDR3 (acides aminés 80 à 100) de la région V1 dans cette interaction; la fonction de ce domaine reste à clarifier, les résultats n'ayant pas été confirmés par d'autres études (Brosky et coll., 1990; Broder et coll., 1993).

Le domaine d'interaction avec le CD4 est localisé dans le domaine C3 de la gp120 (acides aminés 413 à 456), et une délétion de 12 acides aminés dans cette région abolit l'interaction avec le CD4 (Lasky et coll., 1987; Kowalski et coll., 1987; Dowbenko et coll., 1988). D'autres résultats ont montré que des acides aminés présents dans les régions C2 et C4 de la gp120 sont également importants, indiquant que l'interaction dépend de la structure tertiaire de la gp120 (Willey et coll., 1989; Thali et coll., 1992).

L'interaction entre la gp120 et le CD4 induit pour ces deux molécules des changements conformationnels permettant l'exposition de nouveaux domaines jusqu'alors masqués ainsi que la dissociation gp120/gp41 (Walker et coll., 1992; Sattentau et coll., 1991). Une protéase agirait ensuite pour cliver la gp120 au niveau de la région V3 (Hattori et coll., 1989; Werner et coll., 1993). Les étapes ultérieures font intervenir le domaine fusogène de la gp41 (Gallaher, 1987; White, 1990), un récepteur cellulaire de la gp41 (Quershi et coll., 1990) ainsi que d'autres domaines de la gp41 tels que le domaine intra cytoplasmique (Derera et coll., 1992; Freed et coll., 1992). Ces étapes conduisent à la fusion de la membrane virale avec la membrane plasmique, contrairement à ce qui est observé pour d'autres rétrovirus où des mécanismes d'endocytose du récepteur interviennent (Stein et coll., 1987).

D'autres récepteurs du VIH ont été décrits :

- les galactosyl céramides pour les lignées cellulaires d'origine gliale et neuroblastique (Homsy et coll., 1988) et la lignée épithéliale HT29 (Yahi et coll., 1992).
- les récepteurs du complément et de la région Fc des immunoglobulines, avec comme rôle, également, de faciliter l'infection de manière anticorps dépendante pour les cellules CD4<sup>+</sup> (Homsy et coll., 1989; McKeating et coll., 1990; Robinson et coll., 1990; Boyer et coll., 1991).
- les récepteurs CC CKR5 (pour " C-C chemokine receptor 5") cofacteurs pour les isolats macrophageotropes (Alkhatib et coll., 1996)

### I.3.2 La rétrotranscription

L'entrée dans le milieu cytoplasmique déclenche la décapsidation permettant la libération des deux molécules d'ARN génomique. La rétrotranscription est amorcée au niveau d'une séquence de 18 nucléotides de l'extrémité 3' d'un ARN<sub>t</sub><sup>Lys</sup><sub>3</sub>, présente dans les virions matures (Kohlsteadt

et coll., 1992; Jiang et coll., 1993), appariée à une séquence complémentaire PBS pour "Primer binding site", située à l'extrémité 5' du génome viral (Ratner et coll., 1985). Cette liaison fait intervenir les protéines de la nucléocapside (Barat et coll., 1993). Plusieurs étapes se succèdent, faisant intervenir les activités reverse transcriptase et RNase H de la transcriptase inverse ainsi que des transferts de brins d'ADN, pour constituer une molécule d'ADN double brin correspondant au génome viral entier (Luo et Taylor., 1990; Ramesy et coll., 1993). Le transfert des brins négatifs et positifs est également effectué par la transcriptase inverse et nécessite l'activité RNase H (Luo et coll., 1990; Peliska et coll., 1992; Tanese et coll., 1991) (Figure 8).

La rétrotranscription peut débuter dans le virion libre, comme cela a été montré par la présence d'ADN viral dans les virions de culture ou de plasma (Borroto-Esoda et coll., 1991; Lori et coll., 1992; Trono, 1992). Cette rétrotranscription peut avoir lieu dans les fluides biologiques et nécessite la présence des déoxynucléosides triphosphates (Zhang et coll., 1993). Ce phénomène n'est pas encore bien compris, mais il pourrait jouer un rôle essentiel sur l'efficacité de la transmission du VIH (Zhang et coll., 1994).

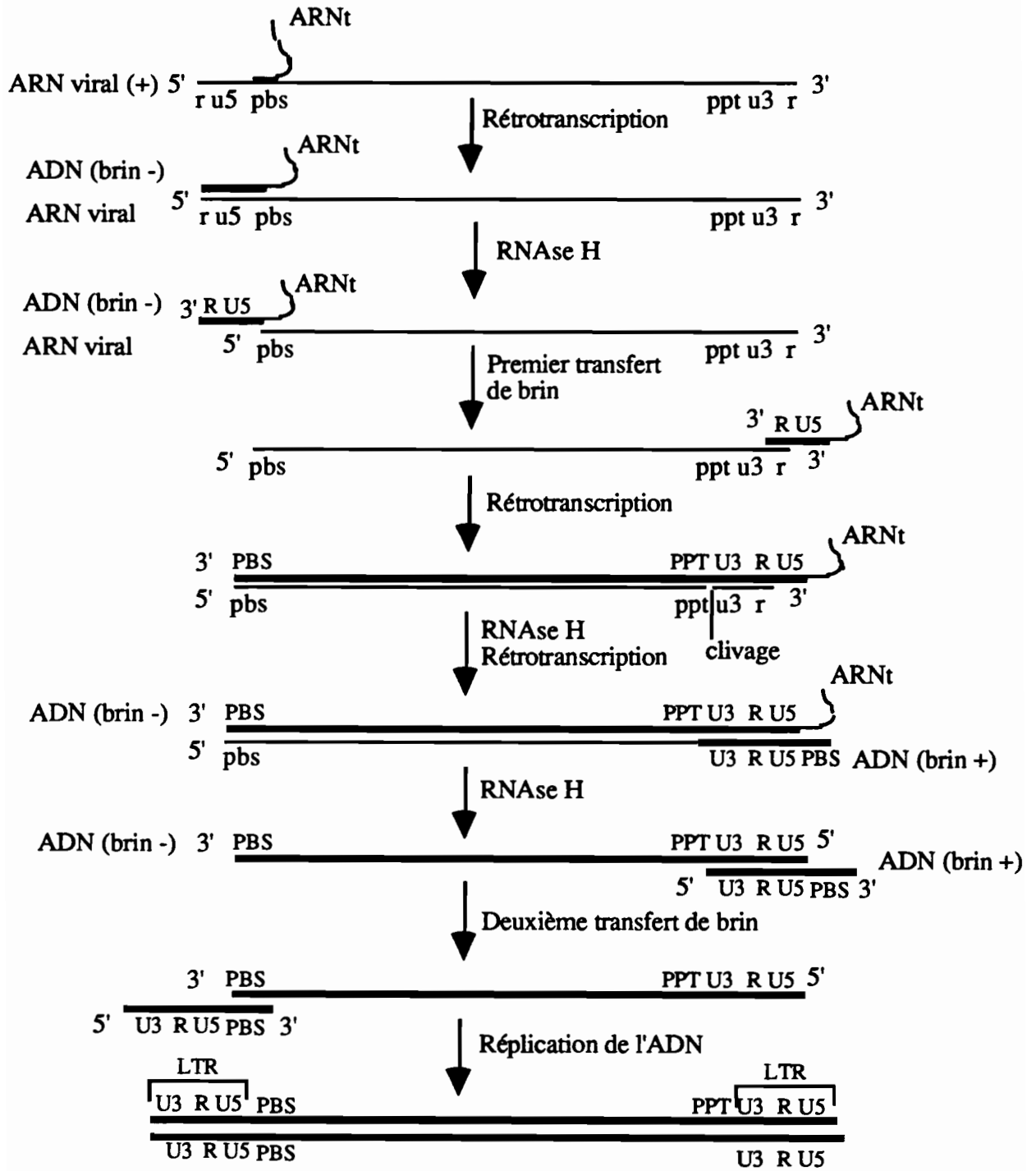


Figure 8: Rétrotranscription du génome viral (d'après Ramsey CA et Panganiban T, 1993)

### I.3.3 Intégration

Après l'étape cytoplasmique de la rétrotranscription, le complexe nucléoprotéique de pré-intégration formé migre dans le noyau (Burkrinsky et coll., 1992). Cette migration se fait grâce aux séquences de localisation nucléaire de la protéine de la matrice p17, de la protéine virale Vpr (Heinzinger et coll., 1994) et aux protéines cellulaires intervenant dans le transport nucléaire. Au sein du complexe de pré-intégration, on retrouve l'intégrase. Elle clive deux paires de bases aux extrémités 3' de l'ADN viral, mais aussi l'ADN cellulaire en générant des extrémités 5' sortantes sur quatre paires de bases. L'énergie fournie par ce clivage est réutilisée par l'intégrase pour créer les nouvelles liaisons phosphodiester entre les deux ADN. Les enzymes cellulaires finissent ensuite les étapes de remplissage et de ligation (pour revue, Goff, 1992)

Scott et collaborateurs (1994) ont montré que le provirus se trouvait intégré préférentiellement au voisinage de séquences transposables présentes dans le génome humain telles que les séquences Alu ou L1; ces régions pourraient en fait être plus accessibles à l'intégrase.

### I.3.4 Transcription

Le provirus intégré est exprimé de la même façon qu'un gène cellulaire, avec l'utilisation de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule hôte.

Les gènes codant pour les protéines virales sont actuellement divisés en deux groupes selon leur expression au cours du temps. On les classe ainsi en gènes précoces et tardifs:

- Les gènes tardifs codent pour les protéines structurales Gag, Pol et Env.
- Les gènes précoces codent pour les protéines régulatrices. Parmi ces gènes on retrouve le gène tat qui code pour la protéine transactivatrice de la

- Les gènes précoces codent pour les protéines régulatrices. Parmi ces gènes on retrouve le gène tat qui code pour la protéine transactivatrice de la transcription virale et le gène rev qui code pour la protéine permettant la maturation et le transport des ARNm mono-épissés dans la cellule infectée.

Trois classes d'ARN apparaissent de façon séquentielle au cours du temps (Pomerantz et al, 1990) :

- Une classe d'ARN multi-épissés de 2 Kb qui codent pour les protéines Tat, Rev et Nef (Kim et coll.,1989). Cette classe d'ARN est la première à apparaître au cours du processus de production virale par la cellule infectée, dans la phase dite précoce.

- Une classe d'ARNm mono-épissés de 4,3 Kb qui codent pour les protéines Env et Vpu, Vif et Vpr.

- Une classe d'ARN de 9,4 Kb qui s'orientent vers deux voies possibles, l'une vers l'encapsidation de l'ARN viral et l'autre vers la traduction, codant alors pour les protéines structurales Gag et Pol. Ces ARN apparaissent en dernier, dans la phase tardive du cycle de réplication.

L'apparition de ces trois classes d'ARN au cours du temps implique un épissage très complexe, qui est régulé de façon équilibrée par les protéines virales et cellulaires. De plus, l'épissage n'est pas le même aux différents stades de la maladie. En effet, il est montré que l'expression des gènes tardifs est beaucoup plus importante lors de la phase SIDA que pendant la phase asymptomatique, et inversement pour l'expression des gènes précoces (Michael et al, 1992).

### **I.3.5 Maturation virale et bourgeonnement**

Les dernières étapes du cycle viral concernent l'assemblage des différents composants des virions, la libération et la maturation de la particule. Ces étapes font intervenir les différentes protéines de structure (Gag) et accessoires

(Vif, Vpr et Vpu) du virus, ainsi que les séquences nécessaires à l'encapsidation de l'ARN génomique viral.

La régulation de ces différentes étapes n'est pas encore élucidée, mais l'étude de virus mutés a permis de mettre en évidence les événements essentiels (Figure 9) (pour revue, Cann et Karn, 1989).

Le signal d'encapsidation est situé entre le premier site donneur d'épissage (dans la région U5 du LTR5') et le premier codon (ATG) de la protéine Gag. Cette séquence, déléetée dans les ARNm viraux, forme une structure secondaire nécessaire pour l'interaction avec la protéine p9 de la nucléocapside (Lever et coll., 1989; Aldovini et coll., 1990; Rizvi et coll., 1993).

Les précurseurs des protéines de structure, p55 gag et p160 gag-pol, s'accumulent au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique de la cellule, et s'ancrent dans celle-ci par l'intermédiaire de la région N-terminale myristilée (Gelderblom et coll., 1987; Gottlinger et coll., 1989). L'ARN génomique viral s'associe alors à la région C-terminale du précurseur gag et on observe une accumulation des glycoprotéines d'enveloppe gp120-gp41. Une particule virale immature est alors libérée, contenant deux copies de l'ARN génomique et deux ARN<sup>t</sup><sup>LYS</sup> nécessaires pour la rétrotranscription.

La dimérisation des précurseurs gag-pol permet l'activation de la protéase virale qui effectue un clivage des précurseurs p55gag. On obtient alors une particule virale mature.

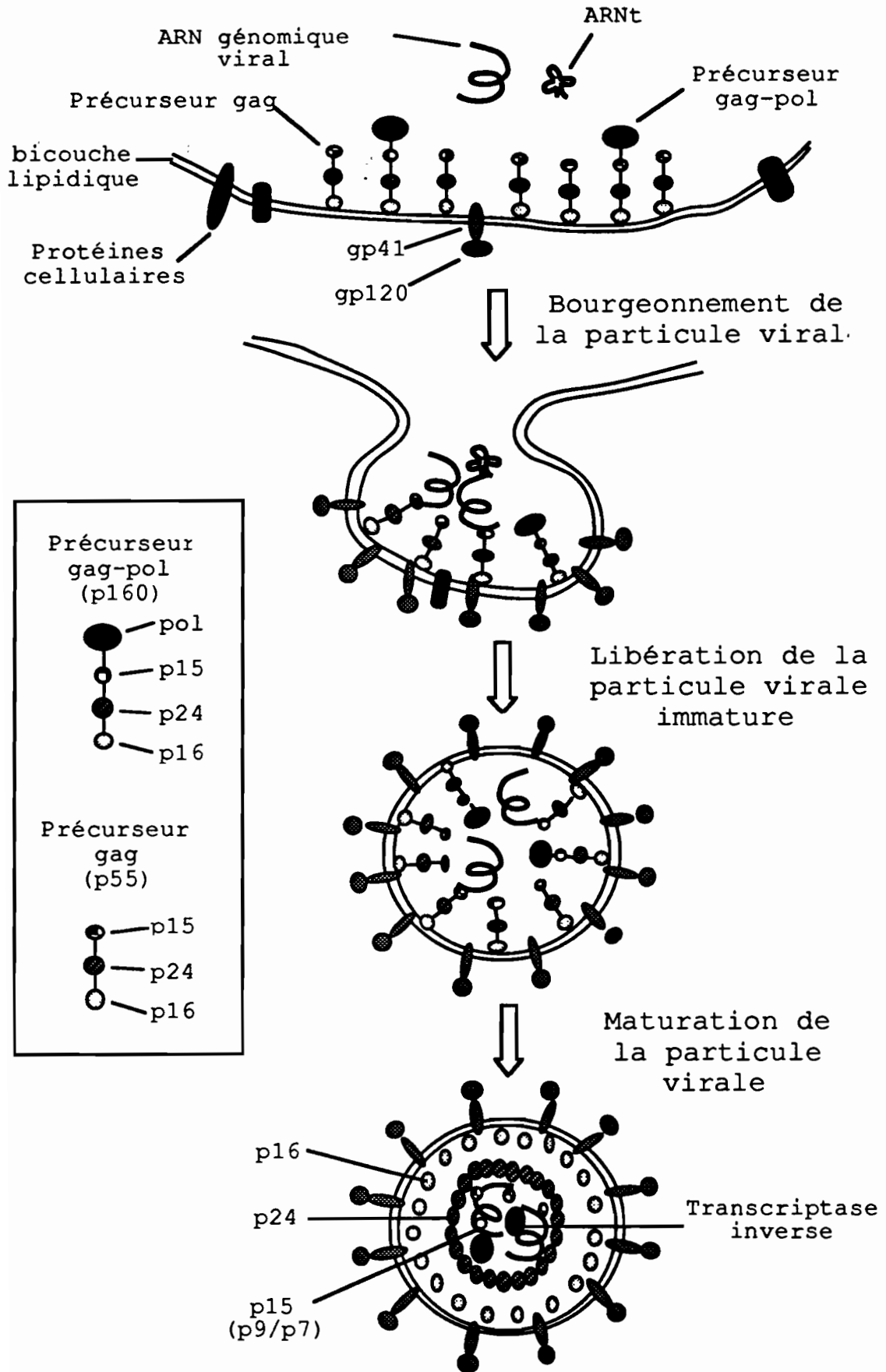


Figure 9 : Assemblage de maturation de la particule virale VIH-1

## II Pathogénèse de l'infection par VIH-1

### II.1 Primo-infection

Cette étape implique toute une série de mécanismes comprenant la dissémination initiale du virus et la mise en place de la réponse immunitaire dirigée contre le virus.

Après l'infection, les patients présentent des symptômes cliniques qui peuvent ressembler à un syndrome de mononucléose (Niu et coll.,1993). Ces symptômes sont regroupés dans le tableau 2.

Signes cliniques	Fréquence en %
Fièvres	96
Adénopathies	74
Pharyngites	70
Eruptions cutanées	70
Myalgies, arthralgie	54
Diarrhées	32
Maux de tête	32
Nausées, vomissements	27
Candidoses orales	12
Neuropathies	6
Encéphalopathies	6

**Tableau 2 :** Symptômes cliniques fréquemment retrouvés lors de la primo-infection symptomatique (Niu et coll., 1993)

La période moyenne entre l'infection et l'apparition des premiers symptômes cliniques a été estimée entre 2 et 4 semaines (Tindall et coll., 1991).

Des longues périodes d'incubations ont été rapportées (Piette et coll.,1986) mais elles restent extrêmement rares. Ces symptômes persistent durant 1 à 3 semaines et peuvent ne pas être tous présents. Cependant, toutes les infections ne sont pas symptomatiques (DeNoray et coll., 1993). Les symptômes des primo-infections sont de sévérité variable, et dans 15% des cas, nécessitent une hospitalisation du patient (Pantaleo et coll.,1995). Cette sévérité des symptômes cliniques dépend en grande partie de plusieurs facteurs comme la fréquence d'exposition, la voie d'entrée du virus, la charge virale de l'inoculum mais aussi des caractéristiques biologiques du virus (Tindall et coll.,1991).

Au cours de la primo-infection, l'intense multiplication virale se traduit par des titres élevés de virus circulant dans le plasma et par un nombre important de lymphocytes infectés. A partir de la 6<sup>ème</sup> semaine post-infection, on assiste à une augmentation de la charge virale plasmatique due à la dissémination du virus dans l'organisme. Vers la 12<sup>ème</sup> semaine, la virémie diminuera puis se stabilisera à un taux très faible durant la phase symptomatique. Le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> baisse progressivement (Figure 16).

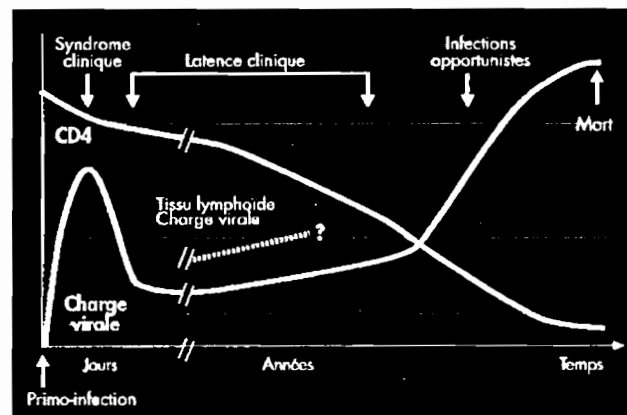


Figure 16 : Evolution de la charge virale au cours de l'infection

(D'après Coffin, 1995)

Au niveau immunologique, on observe une lymphopénie transitoire correspondant à une diminution du taux des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Cette diminution ne dure pas pour les lymphocytes CD8<sup>+</sup> puisque leur nombre

réaugmente rapidement grâce à la réponse immunitaire cytotoxique. On observe alors une inversion du rapport CD4/CD8, chez la majorité des patients en phase de primo-infection (Nui et coll., 1993 Tindall et coll, 1991). La chute du nombre des lymphocytes CD4<sup>+</sup> sanguins correspond à leur destruction par la réplication massive du virus. Durant cette phase, le virus est détecté à des taux élevés dans les différents liquides biologiques : plasma, fluide cérébro-spinal et sperme. La réponse immunitaire à médiation cellulaire contribue à la diminution de la virémie notamment en éliminant les cellules productrices du virus (Koup et coll., 1994).

Il a été montré chez des patients en primo-infection l'apparition de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques des protéines des gènes gag, pol, env (Koup et coll., 1994; Safrit et coll., 1994). D'autre part, Borrow et collaborateurs ont détecté des CTL spécifiques des protéines de régulation comme Tat ou Nef (Borrow et coll., 1994). Les CTL dirigés contre les protéines structurales apparaissent plus tôt que les CTL spécifiques des protéines de régulation (Lamhamedi-Cherradi et coll., 1995), à cause de la forte immunogénicité des protéines de structure.

La réponse humorale intervient peu de temps après la réponse cytotoxique. L'apparition des anticorps dirigés contre le virus est appelé séroconversion. La fenêtre de séroconversion correspond à la période de temps comprise entre l'infection par le VIH-1 et l'apparition des premiers anticorps spécifiques du virus. Cette période a été estimée d'une durée de 2 à 6 semaines, et varie selon les patients (De Noray et coll., 1993). L'apparition des différents anticorps est séquentielle. On trouve dans un premier temps des IgM dans le sérum des patients présentant une primo-infection symptomatique (Healey et coll.,1989). Ces premières IgM sont dirigées contre la protéine Gag (Gaine et coll., 1988). Puis apparaissent les IgG (De Noray et coll., 1993). On retrouve tout d'abord les IgG dirigées contre la protéine p24 virale, puis successivement celles dirigées

contre la gp160, contre la gp120 et la gp41. Apparaissent enfin les IgG spécifiques des protéines codées par le gène pol (De Noray et coll., 1993). La réponse humorale contribue à l'élimination des virions circulant dans le sang.

Les isolats retrouvés durant la phase de primo-infection sont de prédominance macrophageotrope et NSI (isolats incapables d'induire la formation de syncytia) (Zhu et coll., 1993).

### II.3 Latence et évolution de l'infection

La primo-infection est suivie d'une phase de latence clinique, où les patients ne présentent aucun signe clinique, et où leur taux de cellules CD4<sup>+</sup> est supérieur à 200 CD4<sup>+</sup> / mm<sup>3</sup>. Cette période dure en moyenne 8 ans dans le cas de l'infection par le VIH-1. Cependant, il semblerait y avoir une relation entre l'infection primaire symptomatique et l'évolution rapide vers le SIDA. En effet, des patients présentant une période de primo-infection symptomatique évoluent plus rapidement vers la maladie que les patients n'ayant aucun signe clinique lors de la primo-infection (Sinicco et coll., 1990). Il a aussi été constaté que plus la durée des symptômes est longue (> à 14 jours), plus le patient a la probabilité d'évoluer rapidement vers le stade terminal de la maladie (Pedersen et coll., 1989). Boufassa et collaborateurs ont observé que les patients présentant des troubles neurologiques lors de l'infection primaire, évoluaient plus rapidement vers la maladie que les patients ayant une primo-infection symptomatique sans manifestations neurologiques. D'autres études ont montré qu'un faible taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> lors de la primo-infection était corrélé à un mauvais pronostic pour le patient (Sinicco et coll., 1993). Nielsen et collaborateurs ont montré que les patients qui présentent précocément des souches SI atteignent plus rapidement le stade SIDA que ceux qui ont des souches NSI (Nielsen et coll., 1993).

ont montré qu'un faible taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> lors de la primo-infection était corrélé à un mauvais pronostic pour le patient (Sinicco et coll., 1993). Nielsen et collaborateurs ont montré que les patients qui présentent précocément des souches SI atteignent plus rapidement le stade SIDA que ceux qui ont des souches NSI (Nielsen et coll., 1993).

Les premières études, portant sur l'estimation de la charge virale dans le plasma avaient associé la latence clinique de la phase asymptomatique à la latence virale du fait d'une virémie très faible (Levy, 1994).

Cependant, plusieurs auteurs se sont concentrés sur les organes lymphoïdes plutôt que sur le plasma pour plusieurs raisons :

- La majorité des lymphocytes sont présents dans les organes lymphoïdes (Westermann et coll., 1990) et les lymphocytes sanguins ne représentent que 2% des lymphocytes totaux.
- La réponse immune est générée principalement dans les organes lymphoïdes et non dans le sang périphérique (Pantaleo et coll., 1993).
- Lors de la primo-infection, des adénopathies dans les aires cervicales, inguinales, axillaires mais aussi généralisées sont observables dans plus de 75% des cas cliniques (DeNoray et coll., 1993).

Ces études ont montré que les organes lymphoïdes étaient le siège d'une réplification intense du virus et qu'ils sont des réservoirs viraux (Pantaleo et coll., 1991; Graziosi et coll., 1992). De plus, l'utilisation de la PCR "in situ" a montré que jusqu'à 25% des lymphocytes CD4<sup>+</sup> présents dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes étaient infectés (Embretson et coll., 1993).

Des résultats récents montrent que le virus est produit à des taux élevés dans le plasma tout au long de l'infection, avec une "clearance" rapide du virus et des cellules CD4<sup>+</sup> (Ho et coll., 1995; Wei et coll., 1995). Les notions de latence clinique et virale ont donc été dissociées.

Lors de la phase asymptomatique, Schnittman et collaborateurs ont observé que seulement 10% des lymphocytes T infectés sont le siège d'une réplification

virale (Schnittman et coll., 1989). D'autres auteurs ont montré qu'une grande majorité de cellules arbore le provirus, mais n'expriment pas les ARN viraux (Embretson et coll., 1993). Ces cellules sont donc infectées de façon latente car après stimulation par différents mitogènes, elles peuvent produire du virus. En échappant au système immunitaire, ces virus vont pouvoir se disséminer dans l'organisme et produire d'autres virus qui infecteront d'autres cellules. Il a été clairement décrit qu'un blocage dans les étapes de rétrotranscription, d'intégration ou de transcription, induisait un état de latence. Sous l'action de facteurs viraux non identifiés et de facteurs cellulaires, la latence peut s'établir à plusieurs niveaux dans la cellule. La coopération de tous ces facteurs permet donc au VIH-1 de rester le plus longtemps possible dans l'organisme de l'hôte et de se propager progressivement en détruisant le système immunitaire.

#### **II.4 Immunopathogénèse**

Le VIH crée une infection chronique active (Wei et coll., 1995, Ho et coll., 1995) et non une infection latente avec réaction tardive comme cela a d'abord été suggéré. Au cours de l'évolution de la maladie, le virus échappe progressivement au système immunitaire grâce à sa variabilité. Cependant, les mécanismes physiopathologiques induisant ce déficit immunitaire et les manifestations cliniques du SIDA restent imparfaitement élucidés. La destruction du système immunitaire est le résultat de nombreux mécanismes :

- Effet cytopathogène du VIH sur les cellules CD4<sup>+</sup> (Greene, 1991) entraînant leur destruction d'une part, et leur fragilisation d'autre part. Les cellules souches sont également détruites.
- Séquestration des lymphocytes CD4<sup>+</sup> dans les réseaux de FDC (pour "follicular dendritic cells") des ganglions (Pantaleo et coll., 1993)
- Modification de la transduction du signal et des fonctions cellulaires induisant l'apoptose (Pantaleo et Fauci, 1995).

- Immunosuppression par les protéines virales (Viscidi et coll., 1989; Luria et coll., 1991, Garcia et Miller, 1991; Baur et coll., 1994; Spina et coll., 1994).
- Production d'auto anticorps contre les cellules CD4<sup>+</sup> entraînant une cytotoxicité cellulaire (Levy, 1993).
- Production d'un facteur immunosuppresseur par les lymphocytes CD8<sup>+</sup> provoquant une diminution de la réponse immune par les lymphocytes T auxiliaires (CD4<sup>+</sup>) (Levy, 1993).
- Modification de la production des cytokines (Graziosi et coll., 1994).

Il semble que les désordres biologiques et, en particulier immunologiques, caractéristiques de l'évolution de l'infection soient liés à l'intensité de la réplication virale. Ils pourraient également être liés à de multiples événements consécutifs à une action directe ou indirecte du virus médiée par les protéines virales, et à l'activation généralisée du système immunitaire liée à la persistance du virus. Le paradoxe de cette maladie est que la mise en place de la réponse immune destinée à éliminer le virus va au contraire l'aider à s'implanter et à constituer le réservoir viral.

### **II.5 Patients asymptomatiques à long terme : "Long term non progressor"**

Malgré une infection persistante 8 à 12 ans après la séroconversion, certains patients n'ont pas encore évolué vers le stade SIDA (Sheppard et coll., 1993; Levy et coll, 1994). Ils représentent 5 à 10% des patients infectés par le VIH-1. Ils sont appelés "Long term non progressors" ou LTNP. Cette catégorie de patients est définie comme étant infectés depuis au moins 8 ans ou plus, avec un taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> supérieur ou égal à 600 CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, n'ayant pas pris d'antirétroviraux et ne présentant pas de signes cliniques en relation avec l'infection à VIH-1. L'analyse virologique et immunologique de ces patients montre que leur virémie est très faible et que leur réponse immunitaire

cytotoxique contre le virus est élevée (Connor et Ho., 1994; Greenough et coll.,1994; Cao et coll., 1995). Pantaleo et collaborateurs ont observé que la structure des ganglions lymphatiques est normale et que la réponse immune fonctionne normalement (Pantaleo et coll.,1995b). L'analyse génétique des gènes de régulations (*vif*, *vpu*, *tat*, et *nef*) montre dans certains cas la présence de mutations. Dans d'autres cas, aucun dysfonctionnement des gènes de régulation n'est observé (Greenough et coll., 1994). L'analyse des virus présents dans les ganglions et dans le sang montre qu'ils sont infectieux, contredisant l'hypothèse que les virus présents chez ces patients seraient latents ou défectifs. Il a été rapporté que certains allèles du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ont une influence sur la progression rapide de la maladie (Kaslow et coll., 1990). Ainsi, Greenough et collaborateurs n'ont pas retrouvé chez ces patients les allèles (HLA-A1, -CW2, -B8, et -DR3) associés à une progression rapide vers la maladie.

D'autres auteurs ont démontré une résistance des lymphocytes CD4<sup>+</sup> de ces patients au VIH (Williams et Cloyd, 1991). Il est probable que des mécanismes d'origine virale et cellulaire interviennent dans la non progression de la maladie.

## **II.6 Pathogénèse de l'infection à VIH-2**

L'infection par le VIH-2 conduit à l'apparition de tableaux cliniques similaires à ceux décrits pour l'infection par le VIH-1 (Markovitz, 1993). Quelques différences ont été mises en évidence : la période de latence clinique dure en moyenne 15 ans, et la transmission par voie sexuelle (Kanki et coll., 1994; Donnelly et coll.,1993) ainsi que la transmission de la mère à l'enfant (Gayle et coll., 1992) semblent moins efficaces. Pour des patient pris à des stades d'évolution similaire du SIDA, on détecte une charge virale plus faible que dans le cas de l'infection par le VIH-1 (Wittle et coll.,1994).

## **II.7 Conclusion**

Les organes lymphoïdes jouent un rôle très important dans l'immunopathogénèse liée au VIH-1. Ces organes, qui normalement assurent la défense immunitaire, vont être le site privilégié de la réplication du virus, constituant ainsi un réservoir pour le VIH-1 tout au long de la maladie. On assiste à un équilibre constant entre la destruction et la production virale, ainsi qu'entre la destruction des cellules infectées et leur renouvellement. Ces résultats nous montrent à quel point le système immunitaire est efficace, permettant l'élimination d'une très grande quantité de virus et de cellules infectées sans être toutefois capable de les éradiquer totalement de l'organisme. Les réservoirs viraux dans les organes lymphoïdes sont donc primordiaux pour le virus puisqu' ils lui assurent une présence permanente dans l'organisme. A la fin de maladie, les structures des organes lymphoïdes sont détruites irréversiblement et leur fonction immune est irréversiblement perturbée. Progressivement, les cellules immunes infectées ne peuvent plus être renouvelées, basculant l'équilibre en faveur du virus. La réplication virale n'est plus réprimée et le virus peut se disséminer dans tous les organes entraînant de nombreuses pathologies. Le déficit immunitaire crée par la disparition progressive des cellules immunes favorise l'apparition d'infections opportunistes qui conduisent le patient vers la mort.

### **III. Variabilité du VIH**

#### **III.1 Variabilité génétique du VIH**

La caractérisation génétique et le séquençage d'un nombre important d'isolats du VIH-1 ont permis de mettre en évidence une variabilité importante entre ces isolats. Cette diversité génétique est le résultat de l'évolution constante du virus infectant un individu et de l'accumulation de nombreuses mutations. L'analyse phylogénétique des virus d'origines géographiques variées a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs sous-types (ou géotypes) du VIH-1 et du VIH-2 (pour revue, Sharp et coll., 1994).

##### **III.1.1 L'origine de la variabilité**

La transcriptase inverse est considérée comme l'enzyme induisant le plus de mutations dans le génome viral (Robert et coll., 1988; Preston et coll., 1988), puisque son taux d'erreur a été estimé à environ une mutation par génome et par cycle de réplication. Plusieurs facteurs sont responsables du manque de fidélité de cette enzyme. Par exemple, le mécanisme de correction par l'activité 3'->5' exonucléasique est inexistant (Robert et coll., 1988). Ce mécanisme ne peut expliquer à lui seul ce taux d'erreur car la présence d'un nucléotide incorrect crée un tel déséquilibre au niveau énergétique qu'il est généralement auto-éliminé avant l'incorporation du nucléotide suivant (Bebenek et coll., 1993). Plusieurs études ont décrit d'autres mécanismes tels que la translocation et le glissement (Bebenek et Kunkul, 1993), l'addition d'une ou plusieurs purines à l'extrémité 3' de l'ADN naissant (Patel et coll., 1994), les hypermutations G->A (Borman et coll., 1995). En conclusion, la plupart des auteurs s'accordent à dire qu'en moyenne, la transcriptase inverse du VIH-1 est

responsable de 0,1 à 1 mutation par génome et par cycle de réplication. C'est un taux de mutation 30 à 300 fois plus élevé que la polymérase bactérienne (Drake, 1991). Un autre mécanisme peut avoir lieu lors de la rétrotranscription : la recombinaison homologue entre les deux brins de l'ARN viral (Hu et coll., 1990).

### **III.1.2 Diversité génétique du VIH-1**

L'analyse phylogénétique d' un grand nombre de souches VIH-1 a permis de subdiviser ces virus en deux groupes: le groupe M (pour "Major") et le groupe O (pour "Outlier"). Ces deux groupes sont distincts génétiquement.

#### ***III.1.2.1 les sous-types du groupe M***

De nombreuses souches ont été isolées de part le monde et l'analyse phylogénétique du gène de l'enveloppe a permis de les classer en neuf sous-types, allant de A à I (Figure 10). Les sous-types (A, B, C, D, F et G) ont été retrouvés par l'analyse phylogénétique du gène gag (Louwagie et coll., 1993).

L'analyse phylogénétique montre que ces différents sous-types sont tous équidistants. Le pourcentage de divergence des séquences C2V3 de la gp120 au sein d'un même sous-type est compris entre 7 à 20%, alors qu'entre deux sous-type différents il est de 20 à 30% (Kuiken et Korber, 1994).

La répartition géographique de ces différents sous-types est hétérogène. Le sous-type B, contenant les souches prototypes (HIV-1<sub>la1</sub>, <sub>bru</sub>, <sub>IIIB</sub>) est prédominant en Europe et aux Etats-Unis (Myers et coll., 1995). Les premières souches africaines caractérisées appartiennent au génotype D (Alizon et coll., 1986), et la plupart des souches de ce sous-type proviennent d'Afrique Centrale (Myers et coll., 1992; Ranjbar et coll., 1996), mais il est aussi présent en Afrique de l'Ouest et en Ouganda (Janssens et coll., 1994; Bruce et coll., 1994). Le

génotype A est largement représenté dans toute l'Afrique allant de l'Ouest à l'Est (Janssens et coll.,1994a; Janssens et coll.,1994b; Nkengasong et coll., 1994). Le génotype C contient des souches d'Afrique du Sud (Myers et coll., 1995), d'Inde (Dietrich et coll., 1993), de Zambie (McCutchan et coll., 1992) et de Djibouti (Louwagie et coll., 1993). Le sous-type E est très présent en Thaïlande (McCutchan et coll., 1992) et dans d'autres pays d'Asie (Weniger et coll., 1994 Grez et coll., 1994) mais est décrit aussi en République Centrafricaine et au Cameroun (Murphy et coll., 1993; Nkengasong et coll., 1994). Le sous-type F comprend les isolats du Brésil, de Roumanie, du Cameroun, du Gabon et d'Argentine (Potts et coll., 1993; Dumitresco et coll., 1994; Nkengasong et coll., 1994; Delaporte et coll., 1996; Campodonico et coll., 1996). Les génotypes G et H ont récemment été décrits; le sous-type G est présent au Gabon, en Russie, en Ouganda et au Nigeria, et le sous-type H est actuellement décrit au Gabon uniquement (Janssens et coll., 1994; Bobkov et coll., 1994; Kaleebu et coll., 1995; Abimiku et coll.,1994). Les virus du groupe I, les plus récemment décrits l'ont été chez des patients de Chypre (Kostrikis et coll., 1995).

Même si certains sous-types sont majoritairement localisés dans différentes régions géographiques, ils peuvent coexister avec d'autres. Ainsi dans certaines régions d'Afrique, bien que les sous-types A, C et D soient prédominants, les autres sous-types sont aussi retrouvés (Louwagie et coll.,1995).

Actuellement, plusieurs études réalisées en Europe et aux Etats-Unis montrent que la prédominance du génotype B pourrait changer du fait de l'introduction de génotypes caractéristiques d'Afrique et/ou d'Asie (Artenstein et coll., 1995; Arnold et coll., 1995).

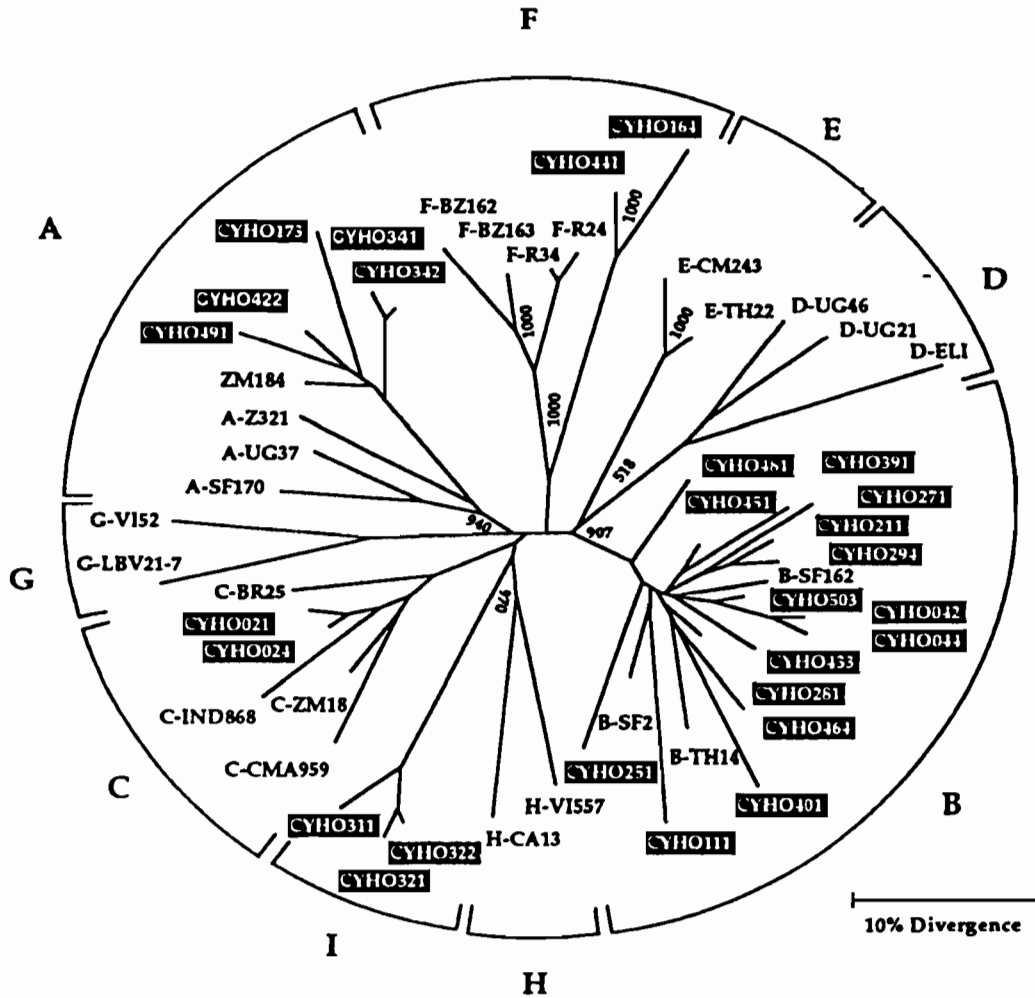


Figure 10 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les 9 sous-types (A à I) du VIH-1 (d'après Kostrikis et coll., 1995)

**III.1.2.3 Mise en évidence d'un nouveau type de VIH-1 :  
groupe O**

En 1990, Deleys et collaborateurs isolèrent une souche VIH-1 à partir d'un patient camerounais présentant une lymphadénopathie généralisée; cette souche fut nommée VIH<sub>ANT70</sub>. L'analyse génétique du génome de cette souche montre qu'elle n'appartient à aucun sous-type du groupe M (Van den Haesevelde et coll.,1994) et qu'elle présente moins de 50% d'homologie sur le gène env avec les souches prototypes VIH-1<sub>HXB2</sub> et VIH-1<sub>MAL</sub> (Van den

Haesevelde et coll.,1994). Une autre équipe a aussi isolé, à partir d'un patient camerounais atteint de SIDA, une souche VIH-1 MVP5180 (Gürtler et coll., 1994). Cette souche présente 53% de similitude avec VIH-1 groupe M et 49% avec VIH-2. L'analyse phylogénétique des séquences du gène env a montré que ces souches étaient très distantes de l'ensemble des souches du groupe M. Cependant leur appartenance au groupe VIH-1 est indiscutable du fait qu'elles possèdent :

- Le gène vpu qui caractérise le groupe VIH-1.
- Le chevauchement des gènes env et nef
- La similarité en taille et en structure de la séquence TAR (pour "Tat Activating Reponse") du VIH-1.

Ces souches ont donc été placées dans un groupe O "pour Outlier". Depuis, plusieurs autres souches ont été isolées à partir de patients camerounais mais aussi chez un patient d'origine caucasienne (Charneau et coll., 1995; Loussert-Ajaka et coll., 1995). L'arbre phylogénétique établi à partir de la région C2-V3 du gène env des différents VIH-1 montre que les deux groupes M et O sont bien distincts (Figure 11). Néanmoins les souches du groupe O sont aussi distantes entre elles que deux souches appartenant à des sous-types différents du groupe M. Il est donc probable que ce groupe contienne également plusieurs sous-types.

La grande variabilité des souches du groupe O résulte en partie de la grande divergence de la boucle V3 que ce soit en taille ou en composition en acide aminés. Ainsi, la plupart des souches VIH-1 du groupe M contiennent le tripeptide GPG au niveau de la boucle V3, alors que celles du groupe O possèdent le triplet GPM ou GPL. De plus les souches du groupe O possèdent un grand nombre d'altérations dans les sites de N-glycosylation de la boucle V3, une modification de la conformation de certaines régions de l'enveloppe de ces souches est donc plus que probable (Loussert-Ajaka et coll.,1995)..

Cette homologie restreinte avec les virus du groupe M a des conséquences directes sur le diagnostic. En effet, les antigènes de synthèse utilisés dans les tests de dépistage sont produits à partir des séquences génétiques du VIH-1 sous-type B, prédominant en Europe et en Amérique du Nord. Cela explique que certains tests de dépistage manquent de sensibilité pour détecter les anticorps dirigés contre les virus du groupe O (Simon et coll., 1994).

Les premières études épidémiologiques indiquent que les infections à VIH-1 groupe O ont une prévalence inférieure à 10% chez les camerounais VIH-1 positifs et rapportent également la présence de ces souches au Gabon (Nkengasong et coll., 1994). En France entre 1990 et 1994, treize patients ont été diagnostiqués comme infectés par le VIH-1 sous-type O (Loussert-Ajaka et coll., 1995). Parmi ces cas rapportés, 11 patients étaient d'origine camerounaise, deux patientes étaient d'origine française, dont une contaminée au Cameroun. Récemment, Peeters et collaborateurs ont détecté des cas d'infections par le VIH-1 groupe O dans différents pays d'Afrique (Sénégal, Togo, Niger, Nigeria, Tchad, Cameroun, Gabon, Zambie) avec une séroprévalence de 0,07 à 2,1% parmi les sérums VIH-1 positifs (Peeters et coll., 1996).

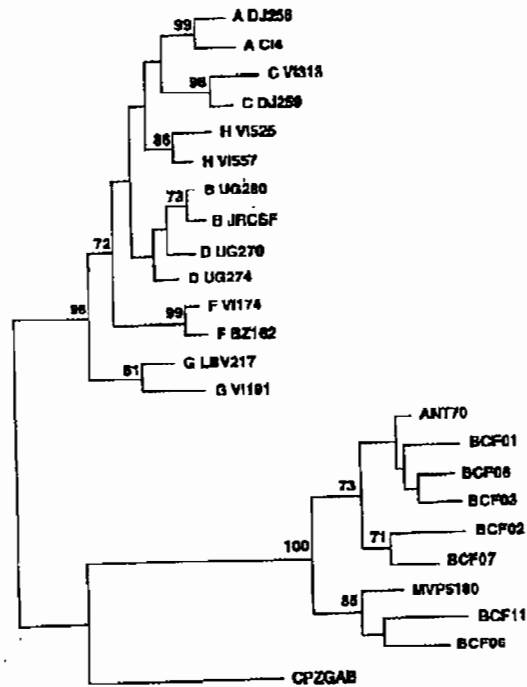


Figure 11 : Arbre phylogénétique représentant les deux groupes du VIH-1  
(D'après Loussert-Ajaka et coll., 1995)

### **III.1.3 Les différents sous-types du VIH-2**

De même que pour le VIH-1, cinq sous-types (A à E) ont été définis pour le VIH-2 (Gao et coll., 1992; Gao et coll., 1994). L'appartenance à un sous-type est indépendante de l'origine géographique des différents isolats étudiés. Ces génotypes sont retrouvés dans toute la zone de répartition du VIH-2 (Afrique de l'Ouest), indiquant une dissémination simultanée des différents sous-types dans ces populations humaines. Plusieurs études ont d'autre part permis de mettre en évidence une plus grande difficulté à isoler le VIH-2 par rapport au VIH-1 (Albert et coll., 1990; Schultz et coll., 1990; Gao et coll., 1994). L'amplification directe de régions du génome viral à partir des cellules du sang périphérique a montré que les souches résistantes à l'isolement étaient très divergentes et correspondaient aux sous-types C, D et E du VIH-2. Les auteurs ont suggéré que ces différences pouvaient être dues à plusieurs facteurs, incluant par exemple le tropisme cellulaire, la régulation de l'expression virale, ou une proportion importante de virus défectifs (Gao et coll., 1994; Sharp et coll., 1994). La corrélation avec des différences de pathogénicité reste cependant à établir.

### **III.1.4 Evolution de la variabilité intrapatient du VIH-1 lors de l'infection par le VIH-1 (quasi-espèces).**

Nous avons vu jusqu'à présent que la variabilité génétique du VIH-1 était très importante dans le monde. Les études portant sur l'analyse du virus tout au long de l'infection montrent que la variabilité intrapatient est elle aussi très élevée. La variabilité chez un même patient évolue pendant la durée de la maladie ainsi que dans les différents tissus. La coexistence de variants VIH-1 très similaires mais distincts génétiquement, chez un même patient, a clairement été démontrée par plusieurs auteurs (Meyerhans et coll., 1989; Balfe et coll., 1990). Ils ont en effet observé qu'un patient ne présentait pas un seul

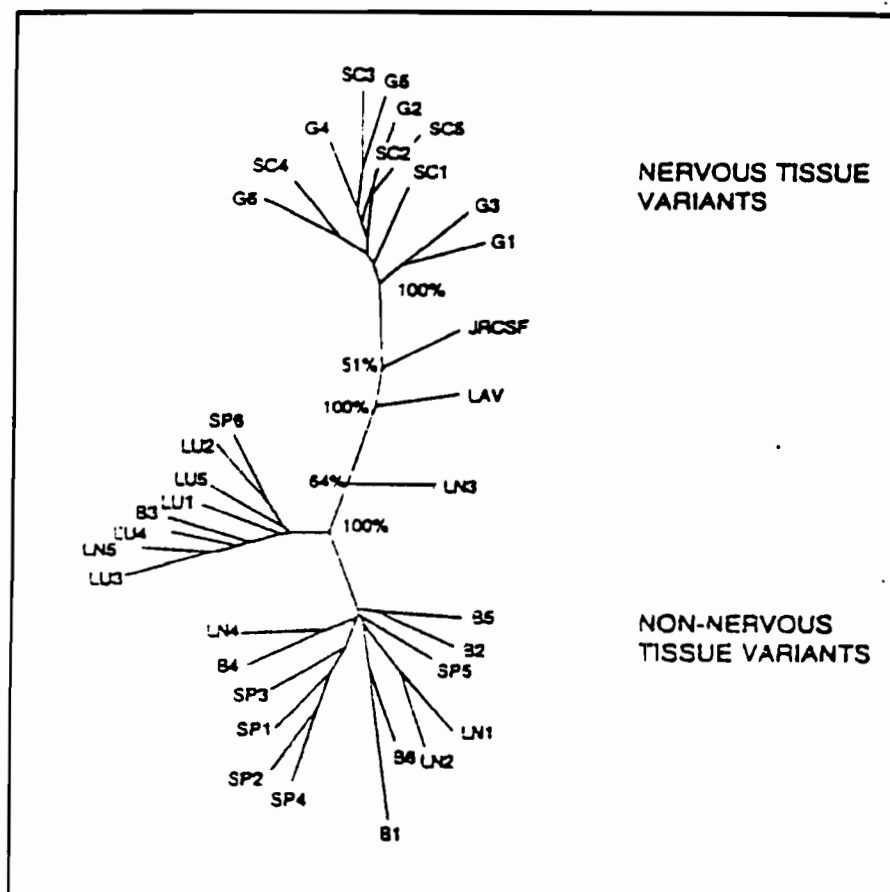
type de virus mais une quantité de variants apparentés, tous dérivés les uns des autres. La variation intrapatient du VIH-1, basé sur l'étude des acides aminés de certaines régions du génome, peut varier de 5 à 17 % en quelques années (Kusumi et coll., 1992; Pedroza Martins et coll., 1992). Ces variants qui sont distincts génétiquement, sont désignés sous le terme de quasi-espèces.

### **III.I.5 Variabilité intrapatient du VIH-1 dans différents organes**

La plupart des études de variabilité du virus ont été réalisées à partir des prélèvements de sang de patient, ce qui donne probablement une image incomplète de la variabilité virale intra-patient. En effet, des études ont montré que le virus était présent dans différents organes (obtenus généralement après autopsie) et qu'il était différent selon l'organe.

Ait-khaled et collaborateurs ont étudié les séquences LTR des souches isolées sur des prélèvements post-mortem de moëlle épinière, de rate, de ganglions lymphatiques, de poumons et de sang (Ait-khaled et coll., 1995). L'analyse phylogénétique de 33 séquences étudiées, représentée dans la figure 12, montre clairement la présence de deux groupes de variants, présents ou non dans le système nerveux.

Deux types d'évolution du virus semblent donc se produire selon le type d'organe infecté. Des résultats identiques sont retrouvés par Korber et collaborateurs qui ont analysé les séquences de l'enveloppe de souches isolées du cerveau (Korber et coll., 1994a) : il y aurait une compartimentalisation des variants viraux, avec deux groupes colonisant respectivement le sang et le cerveau.



**Figure 12 : Arbre phylogénétique établi d'après les séquences de 33 LTR chez un même patient (D'après Ait-Khaled et coll., 1995)**

B = Sang périphérique, LN = Ganglion lymphatique, SP = Rate, LU = Poumon, SC = Moelle épinière, G = Ganglion de la racine dorsale.

L'analyse des souches présentes dans le poumon donne des résultats similaires à ceux observés dans le cerveau. Par l'étude des séquences V3, Itescu trouve que la variabilité intrapatient du VIH-1 dans les poumons suggère une évolution indépendante (Itescu et coll, 1994). Comme dans le cas du cerveau, certaines souches VIH-1 s'adaptent aux cellules monocytes/macrophages et migreraient ensuite vers les poumons. Arrivé dans ce tissu, le virus évoluerait selon les conditions micro environnementales dictées par la présence de micro-organismes, de cytokines et par la pression immunitaire. Concernant les autres tissus, Ball a trouvé que les souches présentes dans le sang à un instant

donné étaient les mêmes que celles retrouvées dans les organes lymphoïdes, mais qu'elles étaient différentes de celles du tissu cardiaque (Ball et coll., 1994). Les mêmes mécanismes de divergence et de colonisation des organes ont été retrouvés dans le modèle simien (Kodama et coll., 1993).

La variabilité du VIH-1 est donc prononcée à l'intérieur de chaque individu. Cette variabilité est un atout pour le virus, car elle lui permet d'une part d'échapper à la réponse immunitaire et d'autre part de s'adapter à certains types cellulaires. Un patient infecté possède donc une multitude de variants compartimentés dans différentes parties de son corps, ce qui rend l'élaboration d'une stratégie vaccinale dirigée contre le VIH-1 très difficile.

### **III.1.6 Recombinaison génétique chez le VIH-1 : les génomes mosaïques**

Le génome du VIH-1 est composé de deux brins d'ARN identique (Coffin, 1990) dont la conformation jouerait un rôle primordial lors du mécanisme de recombinaison. Ce mécanisme est une des causes de la variabilité. Les phénomènes de recombinaison entre les deux brins d'ARN d'une même souche ne vont pas générer des virions très différents par rapport à la souche initiale. En revanche, la présence chez un même patient de différents sous-types du VIH-1 peut aboutir à l'apparition de génomes mosaïques entre différents génotypes. Plusieurs études ont décrits des exemples de coinfection et de virus recombinants. Sabino a observé au Brésil un hybride entre le sous-type F et le sous-type B (Sabino et coll., 1994). Cette souche a été isolée à partir d'une patiente brésilienne contaminée par deux patients infectés respectivement par les sous-types B et F. Diaz et collaborateurs ont étudié le cas d'un nourrisson transfusé avec deux lots d'érythrocytes contaminés par deux donneurs séropositifs différents (Diaz et coll., 1995). L'analyse de certaines régions du génome des souches VIH-1 chez cet enfant a montré la présence de plusieurs types de virus: ceux provenant des deux lots de sang contaminés

ainsi que différentes souches provenant d'une recombinaison entre ces deux virus. Un autre cas a été décrit chez un patient contaminé après des rapports homosexuels avec plusieurs partenaires différents (Zhu et coll., 1995).

Robertson et ses collaborateurs ont analysé le génome de 114 souches VIH-1 référencées et ont noté la présence de 9 génomes mosaïques (Robertson et coll., 1995) (tableau 3). L'analyse phylogénétique de certaines régions du génome de la souche VIH-1<sub>MAL</sub> (Alizon et coll., 1986) a montré que cette souche s'apparentait beaucoup plus à la souche zaïroise VIH-1<sub>ELI</sub> dans le gène env que dans les gènes gag et pol (Li et coll., 1988). Une analyse phylogénétique plus détaillée du génome de cette souche a montré qu'il était morcelé puisque différentes régions d'un même génome ne s'apparentaient pas au même sous-type (Robertson et coll., 1995). En effet, la région de l'enveloppe appartenait au sous-type D alors que les régions gag, pol, et nef appartenaient au sous-type A (Figure 13). Toutes les souches de sous-type E ont été mises en évidence comme des souches recombinantes, elles appartiennent au sous-type E sur la région env et au sous-type A sur la région gag, telle que la souche CM240 (Gao et coll., 1995; Arnold et coll., 1995; Gao et coll., 1996). Récemment, Bobkov et collaborateurs ont isolé un virus dont la gp120 a une structure mosaïque : la région 5' de la séquence gp120 se regroupe avec le génotype G alors que la région 3' se regroupe avec le génotype C (Bobkov et coll., 1996). Ces phénomènes de recombinaison entre différents sous-types sont plus fréquents dans les pays comme le Brésil et certains pays d'Afrique où plusieurs génotypes circulent.

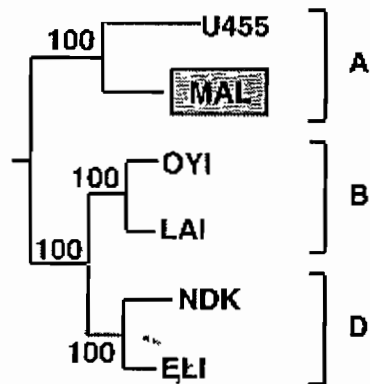
Actuellement plusieurs virus recombinants ont été caractérisés, mais très peu de cas de doubles infections VIH-1 ont été documentés (Arteinstein et coll., 1994). Au contraire, plusieurs cas de double infection VIH-1/VIH-2 ont été observés (Peeters et coll., 1992), mais jusqu'à présent, aucun phénomène de

observés (Peeters et coll., 1992), mais jusqu'à présent, aucun phénomène de recombinaison "in vivo" n'a pu être mis en évidence entre une souche VIH-1 et VIH-2.

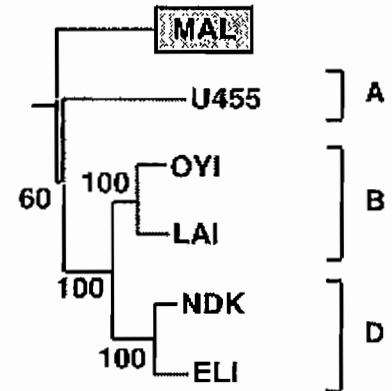
Les phénomènes de recombinaison peuvent jouer un double rôle dans la maintenance du VIH-1 dans l'organisme de son hôte. Ils peuvent induire d'une part une source de variabilité dans le génome du virus, lui permettant ainsi d'échapper au système immunitaire et de s'adapter aux stratégies antirétrovirales.

La découverte de souches hybrides isolées à partir de patients complique donc considérablement la mise au point d'une stratégie vaccinale globale contre le VIH-1.

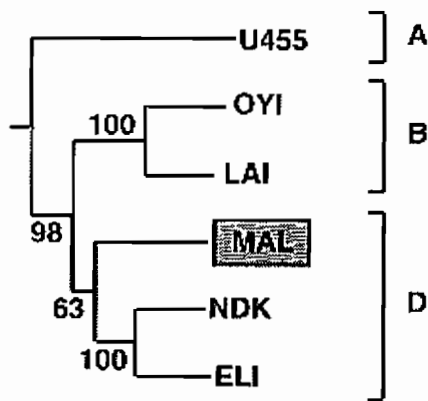
5' gag



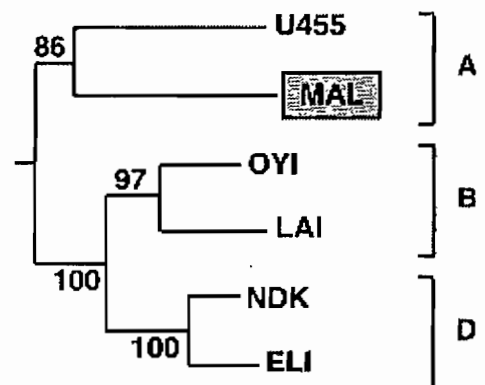
5' pol



env ..



nef



10% divergence

Figure 13 : Arbre phylogénétique comparant les régions gag, pol, env et nef de la souche VIH-1<sub>MAL</sub> à certains isolats du groupe M

(D'après Robertson et coll., 1995).

Isolats	Origine	Gène	Sous-type	Régions
KE124	Kenya	gag	A	1-1050
		gag	D	1083-1477
		env	A	1-1065
		env	D	1096-2435
		env	A	2480-2580
MAL	Zaire	gag	A	1-1068
		gag	D	1101-1518
		env	D	1-2435
		env	A	2482-2580
UG266	Ouganda	env	A	1-199
		env	D	252-2556
CI32	Côte d'Ivoire	gag	A	1-333
		gag	D	417-423
		gag	A	456-1477
G141	Gabon	gag	D	1-261
		gag	A	306-1459
VI354	Gabon	gag	A	1-1154
		gag	G	1245-1465
LBV10-5	Gabon	gag	A	1-1166
		gag	G	1209-1483
ZM184	Zambie	env	C	1-328
		env	A	363-1053
		env	C	1068-1263
		env	A	1270-2547
BZ200	Brésil	gag	B	1-1227
		gag	F	1253-1474

Tableau 3: Exemple de génomes mosaïques d'après Robertson et coll., 1995.

## **III.2 Variabilité biologique**

Un autre aspect important de la variabilité du VIH-1 concerne le tropisme cellulaire.

### **III.2.1 Tropisme du VIH**

Une des particularités remarquables de l'infection par le VIH-1 est le tropisme de ce virus pour les cellules immunocompétentes mais il est également capable d'infecter d'autres types cellulaires. En effet, la culture cellulaire, l'hybridation "in situ" et l'immunocytochimie ont permis de mettre en évidence de nombreux types cellulaires infectables ainsi que la localisation tissulaire du VIH-1 (Tableau 4). Le virus a été détecté dans les tissus hématopoïétiques, dans le cerveau, dans les cellules de Langerhans, dans le tissu gastro-intestinal, dans les poumons et dans les reins (pour revue, Cheng-Meyer, 1990). Le tropisme est assez étendu, le virus s'adapte à chacune de ces cellules. Le virus est capable pour pouvoir se répliquer d'utiliser l'ensemble des facteurs cellulaires s'exprimant dans les différents types de cellules.

La présence du virus dans ces différents tissus semble être corrélée à l'apparition des différents symptômes cliniques observés lors de l'évolution de la maladie vers les stades terminaux. La diminution du nombre des lymphocytes CD4<sup>+</sup> périphériques en est le signe le plus évident. La présence du génome viral dans les cellules macrophagiques et de la microglie dans le cerveau semble jouer un rôle important dans la pathologie au niveau du système nerveux central (Koenig et col., 1986; Wiley et coll., 1986). La détection du VIH dans les cellules cryptiques de la lamina propria au niveau des intestins pourrait expliquer les désordres gastro-intestinaux observés lors de l'infection (Nelson et coll., 1988; Fox et coll., 1989). L'infection des cellules de

Langerhans et des fibroblastes pourrait également jouer un rôle clé dans le développement du sarcome de Kaposi (Vogel et coll., 1988; Ensoli et coll., 1990).

Tissus	Cellules
Hématopoïétique	Lymphocytes T-auxiliaires Macrophages Promyélocytes Cellules dendritiques Eosinophiles
Cerveau	Microglie Cellules endothéliales des capillaires Astrocytes Cellules gliales Macrophages
Peau	Cellules de Langerhans
Gastrointestinal	Cellules épithéliales Cellules entérochromaffines Macrophages Lymphocytes de la lamina propria
Poumons	Fibroblastes Cellules de l'épithélium sinusoïdal
Reins	Cellules épithéliales

Tableau 4 : Types cellulaires infectés par le VIH "in vivo"

(d'après Cheng-Meyer, 1990).

L'enveloppe est en majeure partie responsable du tropisme (Shioda et coll., 1991). En effet des mutations dans la région V3 (Cordonnier et coll., 1989, Cheng-Mayer et coll., 1991; Hwang et coll., 1991; Cann et coll., 1992; Shioda et coll., 1992), ainsi que dans le domaine de fixation au CD4 (Fujita., 1992a),

peuvent le modifier. En plus de sa structure primaire, la conformation de la boucle V3 pourrait être un facteur important (Enbenbichler et coll., 1993). Il a été rapporté que le domaine V1 de l'enveloppe pouvait également être impliqué dans le tropisme (Boyd et coll., 1993). Freed et Martin (1994) suggèrent l'importance de l'interaction entre les domaines V1/V2 et le domaine V3 dans le tropisme cellulaire du VIH-1. Récemment, il a été montré que les interactions des domaines V1/V3 et C4/V3 modifiaient la conformation de la boucle V3 nécessaire à l'infection cellulaire (Carrilo et Ratner, 1996).

Dayton et collaborateurs (1993) ont montré que des mutations introduites dans la région RRE ( pour "Rev Responsive Element") ont des effets sur la réplication virale. Ces effets sont différents suivant les types cellulaires utilisés. La gp 41 joue un rôle dans le tropisme cellulaire du virus (Bergeron et coll., 1992; Fujita et coll., 1992b).

### **III.2.2 Notion de souches "rapid/high" et "slow/low"**

Bien que tous les variants soient capables d'infecter les cellules T CD4<sup>+</sup>, on peut distinguer deux groupes de souches : "rapid/high" et "slow/low". Le premier regroupe les souches isolées de PBMCs (pour "Peripheral Blood Mononuclear Cells") qui se répliquent rapidement et possèdent un taux d'activité "reverse transcriptase" élevé en culture, alors que l'autre groupe contient des souches isolées de PBMCs qui se répliquent lentement et ont un taux d'activité "reverse transcriptase" faible en culture (Fenyö et coll., 1989; Cheng Mayer et coll., 1988). Les caractéristiques biologiques de ces différents phénotypes sont résumées dans le tableau 5.

	"Rapid/high"	"Slow/low"
Isolement à partir PBMCs du patient :		
- temps pour une culture positive	court	long
- activité reverse transcriptase	élevée	faible
Replication dans les PBMCs	rapide	lente
Effet cytopathique	Syncytia (SI)	absence de Syncytia (NSI) ou induisent rarement des Syncytia
Infection des lignées cellulaires:		
- production de l'infection	en continu	absente ou transitoire
- pourcentage de cellules infectées	élevé	faible
- réplication dans les Macrophages	oui	oui
- activité CAT dans les lignées cellulaires	lignée lymphoïde T, lignée monocyte	lignée monocyte

CAT = Coenzyme acétyl transférase

Tableau 5 : caractéristiques biologiques du VIH (D'après Fenyö et coll., 1989)

Les virus "slow/low" se divise en trois sous-groupe selon leur capacité à infecter les différents types de cellules (Schwartz et coll.,1989) :

- le **sous-groupe I** comprend des virus ne se répliquant pas dans les PBMCs ni dans les lignées cellulaires.
- le **sous-groupe II** comprend des virus se répliquant dans les PBMCs mais pas dans les lignées cellulaires .
- le **sous-groupe III** comprend des virus se répliquant à la fois dans les PBMCs et dans les lignées cellulaires.

Des études ont montré que la boucle V3 de l'enveloppe joue un rôle très important dans la détermination du phénotype SI ou NSI. L'introduction par mutagenèse d'acides aminés chargés positivement en position 11 et 25 dans la boucle V3, permet de conférer un phénotype SI à une souche NSI (De Jong et

coll., 1992). D'autres régions de l'enveloppe, comme la région hypervariable V2, jouerait aussi un rôle dans l'acquisition de ce phénotype (Shioda et coll., 1991; Westervelt et coll., 1992; Groenink et coll., 1993; Sullivan et coll., 1993). Ces variants qui ont des phénotypes biologiques différents donneront donc des pronostics différents de l'évolution de la maladie chez le patient.

### *III.2.2.1 Transition NSI->SI au cours de l'infection?*

L'analyse du phénotype biologique, ainsi que les comparaisons des régions V3 des variants isolés à différentes étapes de l'infection, ont permis de suivre cette diversité. Plusieurs hypothèses ont été établies. Lors de la phase asymptomatique, il y aurait un développement préférentiel des souches NSI par rapport aux souches SI (Cornelissen et coll., 1995). Les souches SI, qui se répliquent très vite, seraient, lors de cette phase, éliminées par le système immunitaire, laissant les souches NSI, qui se répliquent plus lentement, se disséminer progressivement dans l'organisme. Par leur capacité de pouvoir se développer dans les macrophages, ces variants NSI auraient un rôle important dans l'établissement de la persistance virale, mais permettraient aussi au virus d'accéder à certains types de tissus (Miedema et coll., 1994). Les souches NSI sont donc largement majoritaires après la séroconversion et vont le rester durant toute la phase asymptomatique. On observe ensuite deux cas de figure : soit le patient évolue très rapidement vers le stade SIDA, soit il reste en phase asymptomatique. Plusieurs auteurs ont montré que la présence de variants SI est associée à une évolution rapide vers le stade SIDA. En effet, des variants isolés au stade SIDA ou ARC seraient des souches SI dans 50 à 60% des cas étudiés (Tersmette et coll., 1989).

L'apparition des variants SI est corrélée à la diminution importante du taux des cellules TCD4<sup>+</sup> et donc une évolution rapide vers le stade SIDA (Schuitemaker et coll., 1992; Connor et coll., 1994). Cependant, Richman et collaborateurs expliquent que, bien que la présence de souches SI chez un patient est corrélée à la chute du taux de cellules CD4<sup>+</sup>, le stade final de la maladie ne sera déterminé que par le nombre de CD4<sup>+</sup> restant et non par le type de variants présents à ce stade (Richman et coll., 1994). En effet, deux patients ayant un taux de CD4<sup>+</sup> inférieur à 50CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> de sang et étant chacun infecté respectivement par un variant SI et NSI, auront autant de chance de développer des infections opportunistes et de mourir; par contre, pour des patients ayant cette fois-ci des taux de CD4<sup>+</sup> beaucoup plus élevés, le risque d'évoluer rapidement vers le stade SIDA sera beaucoup plus important pour le patient présentant le variant SI. Certaines études tendent tout de même à contredire le phénomène de transition NSI->SI lors de la phase SIDA. Des analyses sur des prélèvements post-mortem d'une série de patients décédés du SIDA n'ont pas pu mettre en évidence la présence "in vivo" de variants SI (Donaldson et coll., 1994a; Kasper et coll., 1994). Ces observations ne sont donc pas une généralité et un patient peut atteindre le stade SIDA sans jamais avoir eu une souche SI.

Des études récentes ont pu mettre en évidence des variants SI et NSI chez des patients infectés par des souches appartenant à d'autres sous-types que le B avec notamment des souches du sous type A, D et E (DeWolf et coll., 1994, Zharp, 1994, Zong et coll., 1995).

### **III.3 Variabilité antigénique**

La variabilité antigénique du virus est la conséquence des différentes pressions immunitaires imposées par l'hôte. Les anticorps générés au cours de la primo-infection sont incapables de neutraliser le virus isolé du patient à un

stade plus avancé de la maladie (Gousdmit et coll., 1991). De plus, il a été montré que les anticorps neutralisants développés au cours de la maladie, étaient incapables de neutraliser des nouveaux variants (Arendrup et coll., 1992).

McKnight a montré que la variabilité du VIH-1 chez un patient est modifiée par la réponse immune et par la colonisation de nouveaux types cellulaires (McKnight et coll., 1995). Ces auteurs ont vu "in vitro" qu'une souche infectant les cellules CD4<sup>+</sup> du cerveau perdait son tropisme pour les macrophages et pouvait être neutralisée par un anticorps monoclonal AntiV3. Si l'anticorps est mis en présence de la souche, celle-ci, dans le but d'échapper à cette pression immune, réacquiert son phénotype initial c'est-à-dire un tropisme préférentiel pour les macrophages. Le VIH-1 est donc capable de s'adapter à l'environnement imposé par l'hôte, confirmant ainsi la forte capacité du virus à modifier certaines régions de son génome.

#### III.4 Signification de la variabilité

Le VIH-1 est doté d'une très forte capacité de variation. Lorsqu'un patient est infecté, le virus peut grâce à cette variabilité, s'adapter et faire face aux différentes conditions environnementales qui lui sont imposées. Même si une multitude de variants générés chez le patient sont éliminés ou défectifs, il y aura toujours une souche qui échappera au système immunitaire, qui s'adaptera et colonisera différents tissus. Le variant évoluera à nouveau en fonction des nouveaux tissus qu'il infectera, mais également au cours de la progression de la maladie. La variabilité du VIH-1 lui permet donc de s'adapter à l'environnement hostile induit par son hôte, mais surtout d'évoluer de façon à ne jamais être totalement éliminé par son hôte. La variabilité intrapatient du VIH-1 étant déjà assez prononcée, il semble donc logique que la

variabilité interpatient soit encore plus prononcée. Comme nous l'avons vu, la diversité du VIH-1 varie grandement dans le monde.

### **III.4.1 Variabilité et pathogénèse**

Aucune corrélation entre la variation génétique et les caractéristiques biologiques du virus telles que, la transmission, la pathogénèse et la période d'incubation n'a été clairement établie. Cependant comme pour d'autres lentivirus, certains peuvent avoir une pathogénicité différente. Ainsi, il a été rapporté que le profil de certaines séquences de la boucle V3 du VIH-2 étaient corrélées de façon significative au stade clinique du patient (Boeri et coll., 1992; Kumar et coll., 1990). Des preuves indiscutables indiquent que les motifs de la boucle V3 ont d'importantes répercussions sur les propriétés biologiques et antigéniques du virus (Hwang et coll., 1991; Wertervelt et coll., 1991). Une altération dans la boucle V3 provoque des modifications du tropisme cellulaire, entraînant ainsi la destruction du système immunitaire et les maladies du système nerveux central (Weiss et coll., 1993). D'autre part, l'histoire naturelle de l'infection à VIH-1 peut être influencée par la variation génétique à travers la modification de certaines caractéristiques biologiques telles que la fixation sur le CD4, la fusion, l'infectivité virale, la cytopathogénicité, le potentiel immunosuppresseur et probablement beaucoup d'autres propriétés virales non encore documentées. Les raisons pour lesquelles certains patients infectés par le VIH-1 développent la maladie beaucoup plus rapidement que d'autres ne sont pas claires. La variation antigénique peut influencer la pathogénèse. En effet, très tôt dans l'infection par le VIH-1, l'hôte développe des réponses immunes appropriées au virus, ce qui explique probablement la longue période asymptomatique qui suit la séroconversion. A cause de l'altération de l'antigène, le virus échappe aux réponses immunitaires, s'en suit l'apparition de variants antigéniques

distincts capables de perturber le système immunitaire déjà diminué, il en résulte l'évolution de la maladie vers le stade SIDA (Nowak et coll., 1993).

#### **III.4.2 Variabilité et développement du vaccin**

La variation antigénique des virus VIH-1, a des implications pour le développement de vaccins élaborés à partir d'une seule souche virale (ou d'un sous-type), dans la mesure où un prototype vaccin basé sur un seul type de virus pourrait ne pas entraîner une réponse immune suffisamment large pour protéger contre les virus des autres sous-types. Il faudrait donc développer un vaccin capable d'induire une large immunité "cross-protectrice" contre une pléthore de variants et de sous-types.

#### **III.4.3 Variabilité et diagnostic**

La variabilité génétique peut également avoir un effet sur la sensibilité des tests commercialisés pour le diagnostic. Une séronégativité des tests VIH-1/VIH-2 a été rapportés chez des individus infectés avec des variants VIH-1 du groupe O avec les systèmes ELISA basés sur l'utilisation de peptides synthétiques (Loussert-Ajaka et coll., 1994).

Cette variabilité peut intervenir aussi sur l'efficacité du diagnostic par PCR par la présence de mutations dans les régions d'appariement des amorces, empêchant ainsi une amplification efficace (Loussert-Ajaka et coll., 1995).

#### **III.4.4 Variabilité et épidémiologie**

Enfin, la variabilité peut influencer l'épidémie du VIH pour certains génotypes qui sont plus transmissibles et plus infectieux. Par exemple, il a été rapporté que la propagation hétérosexuelle du VIH-2 était plus lente que celle du VIH-1 (Kanki et coll., 1994). En Thaïlande, l'épidémie à VIH-1 a débuté dans la population des toxicomanes par voie intraveineuse, et parallèlement

dans la population hétérosexuelle (Brown et coll., 1994). Deux génotypes de VIH-1 distincts ont été identifiés: A et B (Ou et coll., 1993). Les variants de sous-type A thaïlandais appartiennent en effet au sous-type E d'après la classification (Weniger et coll., 1994) dont le prototype est VIH-1<sub>T7794</sub> (Myers et coll., 1992). Ces variants sont apparentés aux virus retrouvés en République Centrafricaine (Murphy et coll., 1993; Girard, 1993). Les variants B thaïlandais appartiennent au sous-type B, mais sont différents des variants VIH-1/LAI,MN,SF2 trouvés en Amérique du Nord et en Europe (Myers, 1993). Les variants B thaïlandais sont caractérisés par le motif GPGQ au niveau de la boucle V3, se distinguant ainsi du consensus du sous-type B (GPGR) (Ou et coll., 1993). La divergence à l'intérieur des sous-types E et B thaïlandais est de 5,3 et 4,3% respectivement (Kalish et coll., 1995). La prévalence du sous-type E est plus élevée dans la population hétérosexuelle que dans la population des toxicomanes. Récemment, Kunanusont et collaborateurs ont suggéré que les variants de sous-type E se transmettaient plus efficacement et de manière significative par voie hétérosexuelle, de l'homme vers la femme (Kunanusont et coll., 1995). En Inde et en Thaïlande, où la transmission hétérosexuelle du VIH-1 est majoritaire, la prévalence des variants de sous-type B reste stable alors que celle des variants C et E augmente. Ces observations suggèrent que des facteurs intrinsèques aux virus pourraient être fondamentaux pour expliquer les différences d'efficacité de la transmission hétérosexuelle observées en fonction des génotypes viraux. En effet, il a été montré "in vitro" que le sous-type E possédait une plus forte capacité à infecter les cellules de Langherans, cellules présentes en grande quantité dans les muqueuses génitales, que les autres sous-types (Soto-Ramirez et coll., 1996).

La caractérisation des variants génétiques provenant de diverses zones géographiques, de leurs propriétés antigéniques et biologiques demeure essentielle. Les bénéfices potentiels de telles études sont :

- la classification génétique des virus VIH-1 en sous-type et l'identification des souches hautement divergentes qui pourraient échapper aux tests de diagnostic. S'ils sont identifiés, les antigènes dérivés de telles souches pourront donc être inclus, assurant ainsi une meilleure sensibilité des tests de dépistage courants.
- la compréhension des variants "indigènes" VIH-1 prédominant dans des régions définies pour inclure leurs antigènes dans un cocktail vaccinal. De plus, cela aidera à l'évaluation d'essais vaccinaux dans ces régions où prédominent certains sous-types.
- l'étude de la variabilité peut nous amener à définir un ou des gènes fonctionnels de VIH-1 qui contrôlent les propriétés biologiques des différents virus. Ceci permettra probablement le développement d'approches préventives et/ou thérapeutiques qui seront efficaces dans le contrôle de tous les isolats viraux dans toutes les régions géographiques.

## **IV Epidémiologie de l'infection à VIH**

### **IV.1 Mode de transmission**

Depuis le début de l'épidémie, trois principaux mode de transmission de l'infection ont été observés : transmission horizontale, par voie sexuelle, et par contact avec les fluides biologiques essentiellement le sang, et transmission verticale, de la mère à l'enfant (pour revue Levy, 1993). L'efficacité de transmission dépend essentiellement de la charge virale retrouvée dans les différents fluides biologiques. Ainsi, des charges virales importantes ont été détectées dans le sang (Clark et coll., 1991; Pan et coll., 1993), les fluides cervicaux et vaginaux (Henin et coll., 1993), et le sperme (Borzy et coll., 1988).

Durant les premières phases de l'épidémie, la transmission homosexuelle était le mode prédominant dans la plupart des pays industrialisés. Cependant,

ces cinq dernières années, la transmission hétérosexuelle a progressé dans ces pays (Quinn et Fauci, 1994; Haverkos et Quinn, 1995a). La transmission sexuelle est très importante, et correspond à 75% des infections à VIH dans le monde (Quinn, 1996).

La transmission du VIH de la mère à l'enfant englobe la transmission pendant la grossesse, pendant l'accouchement et par l'intermédiaire du lait maternel. Le taux de transmission verticale varie selon les régions entre 13 et 52% (Peckham et Gibb, 1995; Working Group on Mother-to-child, 1995).

#### **IV.2 Epidémiologie générale**

Depuis l'identification du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) en 1981 et la découverte du virus responsable en 1983, la pandémie n'a cessé d'augmenter. Au premier Janvier 1995, l'O.M.S. (Organisation Mondiale de la Santé) estime à plus de 18 millions le nombre total de cas d'infection par le VIH, avec quasiment 2/3 des cas en Afrique subsaharienne (bilan O.M.S., janvier 1995). Dans le monde, il y a 3 hommes infectés pour 2 femmes, et d'ici l'an 2000, le nombre de nouveaux cas devrait être identique pour les 2 sexes, s'accompagnant d'une augmentation du nombre d'enfants naissant porteurs du virus, actuellement estimé à 1 million. Ces enfants développent rapidement un SIDA et meurent en général avant l'âge de 5 ans (Bilan O.M.S., 1994).

Les projections actuelles de l'O.M.S. pour l'an 2000 font état d'un total cumulé de cas d'infection à VIH de 30 à 40 millions, dont plus de 90% dans les pays en développement, avec 10 millions de cas de SIDA chez l'adulte.

La caractérisation des sous types VIH-1 a permis de mettre en évidence une distribution géographique des différents génotypes. Ainsi en Europe et aux Etats-Unis, le sous-type B est majoritaire alors qu'en Thaïlande, le sous-type E est dominant, et le sous-type B minoritaire. L'ensemble des autres sous-types

est représenté en Afrique subsaharienne et en Asie. Les raisons pouvant expliquer la ségrégation observée des variants VIH-1 dans le monde ne sont pas tout à fait connues. Elles semblent être liées aux modes de transmission et aux facteurs socio-culturels.

On observe donc deux types majoritaires d'épidémie d'infection par le VIH-1: **l'épidémie de type I**, qui sévit principalement en Europe et aux Etats-Unis. Elle est caractérisée par une prédominance de variants de génotype B et par une transmission par voie sanguine (toxicomanie par voie intraveineuse) ou par homo/bisexualité masculine. La transmission hétérosexuelle du VIH existe, mais reste minoritaire. Ce type d'épidémie tend à se stabiliser ou à décroître. **L'épidémie de type II** est présente en Afrique subsaharienne et en Asie. Elle est caractérisée par une prédominance des variants de génotype non-B et par une transmission hétérosexuelle majoritaire. Cette épidémie est en augmentation (Quinn,1996).

L'évolution de la pandémie à VIH se déroule en 4 phases : émergence, dissémination, intensification, et stabilisation (Quinn, 1996). L'infection se propage dans les populations sexuellement actives, constituées de prostituées et de leurs clients dans les pays en voie de développement alors que dans les pays industrialisés, elle atteint la population homosexuelle. Le virus se dissémine rapidement. Cette propagation est le résultat de facteurs socio-culturels et socio-économiques, surtout en Afrique Subsaharienne. La phase d'intensification est caractérisée par d'autres facteurs tels que la transmission du VIH. Cette transmission est amplifiée dans les populations à haut risque (la toxicomanie, les polytransfusés, les individus à partenaires multiples) et dans la population générale des pays en développement. Cette phase est illustrée par le cas de l'Asie du sud où l'épidémie s'est propagé très rapidement ces 5 dernières années (4 millions de cas d'infection à VIH). La quatrième phase correspond à une stabilisation de la pandémie comme cela est observé

actuellement en Australie, en Amérique du nord et en Europe de l'Ouest. Ces changements pourraient résulter de l'efficacité de la prévention. Cette stabilisation indique que le taux de mortalité par le SIDA est équivalent au nombre de nouveau cas d'infection.

En Afrique subsaharienne, la présence du virus dans la population remonte à plusieurs dizaines d'années. Les données épidémiologiques prouvent que c'est à partir de la fin des années 70 qu'il a diffusé (Piot et Kapita, 1991). La transmission hétérosexuelle demeure le principal mode d'infection. Dans la population hétérosexuelle, la majorité des adultes infectés sont des femmes. Cette différence par rapport aux pays industrialisés peut s'expliquer par les facteurs sociologiques et biologiques précis, comme le commerce du sexe, la polygamie, le multipartenariat. La prévalence parmi les femmes enceintes est de 5 à 35% avec un taux très élevé dans les zones urbaines telles que Blantyre, Kampala, Lusaka, Kinshasa et Abidjan (Miotti et coll., 1990; The Working Group on Mother-to-children transmission, 1995). 50 à 65% d'infections à VIH sont retrouvées dans l'est et le centre de l'Afrique. Ces régions correspondent à 15% de la population totale subsaharienne. Récemment, des études sérologiques indiquent que la pandémie s'étend à l'ouest et au sud de l'Afrique. Cette évolution pourrait être liée aux mouvements des populations (pour revue, Quinn, 1994).

En Asie, l'épidémie VIH a débuté vers la fin des années 80. La diffusion a été très rapide, essentiellement au départ chez les utilisateurs de drogue par voie intraveineuse. A partir de 1989, la transmission hétérosexuelle a augmenté rapidement, elle constitue actuellement le mode prédominant de transmission du VIH. L'Inde est le pays le plus touché, la prévalence est estimée à 5 millions de personnes infectées par le VIH (Bollinger et coll., 1995). L'épidémie existe déjà en Thaïlande, à Myanmar (Byrma) et commence au

Cambodge, au Vietnam, en Indonésie, en Chine, à Taïwan, à Singapour et aux Philippines (Kaldor et coll., 1994).

En Amérique latine et aux Caraïbes, le modèle épidémiologique de diffusion a évolué rapidement: des populations d'homosexuels, aux bisexuels masculins et aux toxicomanes, puis progression dans la population hétérosexuelle (Quinn, 1996). Par exemple, on peut citer l'exemple du Brésil où le pourcentage des cas de SIDA imputables à la transmission hétérosexuelle est passé de 7,5% en 1987 à 26% en 1994 (O.M.S., 1995). L'infection à VIH parmi les toxicomanes est également en augmentation: en Argentine où la prévalence chez les toxicomanes est de 30 à 50% (O.M.S., 1995). A Haïti, 8 à 10% de la population urbaine et 5% de la population rurale sont infectés (Pape et coll., 1993). Au Caraïbes, 70% de nouveau cas sont observés chez les adultes de 20 à 45 ans et 12% chez les enfants jusqu'à l'âge de 15 ans (Haverkos et Quinn, 1995b).

Les autres régions du monde, Afrique du nord et Moyen Orient restent peu touchées, la propagation est plus récente.

La situation tend à se stabiliser en Europe de l'Ouest, alors qu'en Europe du sud et en Europe orientale, la situation est préoccupante. Les différents modes de transmission y sont présents. En effet, en Bulgarie, 75% des cas d'infection sont dus à la transmission hétérosexuelle. En Pologne, la prévalence de l'infection à VIH est de 70% dans la population de toxicomanes. Certains pays ont connu des flambées localisées de transmission du VIH parmi les nourrissons et les jeunes enfants; elles sont la conséquence d'actes médicaux pratiqués sans respecter les normes sanitaires. En effet, plusieurs enfants ont été contaminés par le biais de piqûres avec des seringues déjà utilisées et contaminées avec du sang infecté par le VIH (Pokrovsky et coll., 1990). Quand à l'épidémie survenue en Roumanie, elle est probablement due à

la transfusion de sang non contrôlé et éventuellement à l'utilisation d'aiguilles et de seringues non désinfectées ni stérilisées (O.M.S., 1995).

Les premières descriptions du VIH-2 provenaient d'individus vivants au Sénégal, en Afrique de l'Ouest (Barin et coll., 1985). De faibles prévalences ont été retrouvés dans d'autres pays possédant des relations socio-économiques avec l'Afrique de l'Ouest, tels que certains pays d'Europe (Rey et coll., 1987; Smallman et coll., 1990), ou certains pays possédant un passé socio-économique avec ces régions d'Afrique comme le Portugal, l'Angola (Bottiger et coll., 1988), le Mozambique (Barreto et coll., 1993), le Brésil (Cortes et coll., 1989), et l'Inde (Bollinger et coll., 1995). Le VIH-2 se propage de la même manière que le VIH-1. Certaines différences dans l'épidémiologie et la virulence clinique sont observées. Ces différences sont résumées dans le tableau suivant.

	VIH-2 versus VIH-1	références
Mode de transmission	identique	
Probabilité de transmission périnatale	0 à 4% par naissance pour VIH-2 versus 25 à 35 % par naissance pour VIH-1	Kanki, 1988; Andreasson et coll., 1993
Probabilité de transmission sexuelle	Approx. trois fois plus faible pour VIH-2	Kanki et coll., 1994
Taux de développement d'une anergie cutané	plus faible pour VIH-2	Marlink et coll., 1994
Pourcentage du déclin des lymphocytes CD4	Approx. 1% par an pour VIH-2 versus approx. 10% par an pour VIH-1	Marlink et coll., 1994
Pourcentage de développement du SIDA	<0,5% par an pour VIH-2 versus 3 à 5% par an pour VIH-1 dans une même cohorte	Marlink et coll., 1994; Traore, 1995.

Tableau 6 : Différences cliniques entre l'infection par le VIH-2 et l'infection par le VIH-1 (D'après Marlink, 1996).

Le faible pourcentage de transmission sexuelle du VIH-2 comparé à celui du VIH-1 permet d'expliquer pourquoi le VIH-2 a eu une diffusion géographique plus restreinte, tandis que le VIH-1 s'est propagé dans le monde sur la même période de temps. Cette faible transmission du VIH-2 est due à la faible charge virale chez le patient. (Kanki et coll., 1994; Wittle et coll., 1994).

## V. Les virus de l'immunodéficience simienne

Les premiers lentivirus simiens furent isolés en 1985 (Daniel et coll., 1985) à partir de macaques rhésus captifs (*Macaca mulatta*) présentant des lymphomes et des déficits immunitaires, et furent désignés par SIV<sub>mac</sub> (pour "Simian Immunodeficiency Virus from macaque"). L'organisation génétique

de ces virus est identique à celle du VIH-2 (Chakrabarti et coll., 1987). L'infection expérimentale de macaque rhésus par ces virus conduit à l'apparition rapide de signes cliniques similaires à ceux observés chez les sidéens (Letvin et coll., 1985). Des virus identiques furent ensuite identifiés chez d'autres espèces de macaques en captivité et des mangabés (*Cercocebus atys*) au centre de primatologie de Delta (Murphey-Corb et coll., 1986). Les isolats furent désignés SIV<sub>sm</sub> (pour "SIV from sooty mangabey"). Une étude sérologique de la colonie mangabés de Yerkes, d'où provenaient ceux de Delta, montra que 80% des animaux étaient séropositifs pour le SIV (Fultz et coll., 1986). Ces singes ne présentaient aucun signe d'immunodéficience, contrairement aux macaques inoculés avec des tissus provenant de ces mangabés. La surveillance épidémiologique des macaques dans leur habitat naturel n'a pas permis de mettre en évidence d'infection SIV (Lowenstine et coll., 1986; Ohta et coll., 1988). En revanche, les mangabés d'Afrique de l'Ouest sont naturellement porteurs d'un SIV (Fultz et coll., 1986). De ces données, il a été conclu que le SIV<sub>mac</sub> provenait d'une transmission interspécifique en captivité et que l'apparition d'un SIDA chez le macaque résultait d'un changement d'hôte du SIV<sub>sm</sub>.

D'autres SIV sont caractérisés chez des espèces de singes naturellement infectés. Il s'agit de virus isolés à partir du mandrill (*Mandrillus sphinx*), SIV<sub>md</sub> (Tusujimoto et coll., 1988; Tusujimoto et coll., 1989), du Singe vert (*Cercopithecus aethiops*), SIV<sub>agm</sub> (Daniel et coll., 1988; Ohta et coll., 1988), et du cercopithèque à diadème ou singe de Sykes (*Cercopithecus mitis*), SIV<sub>syk</sub> (Emau et coll., 1991; Hirsh et coll., 1993). D'autres sont isolés à partir de chimpanzés (*Pan troglodytes*) SIV<sub>cpz</sub> pour lequel trois isolats sont caractérisés (Peeters et coll., 1989; Huet et coll., 1990; Peeters et coll., 1992; Janssens et coll., 1994; Van den Haesevelde et coll., 1996). Ces virus ne semblent pas pathogènes pour leur hôte naturel. La comparaison des phases ouvertes de lecture des lentivirus de primates permet de distinguer plusieurs groupes : le VIH-1 et le

SIVcpz se distinguent par la présence du gène vpu. Le gène vpx caractérise le VIH-2, le SIVsm et le SIVmac (Chakrabarti et coll., 1987; Hirsh et coll., 1989).

## **VI Classification des lentivirus de primates**

Les analyses des séquences nucléotidiques ou protéiques ont permis de construire l'arbre phylogénétique représenté dans la figure 15, qui met en évidence cinq groupes équidistants et distincts : un premier constitué par le VIH-1 groupe M, groupe O et les SIVcpz, un deuxième regroupant les VIH-2, les SIVsm et les SIVmac, les trois autres groupes étant constitués par les SIVagm, le SIVsyk et le SIVmnd. Les distances évolutives étant calculées en déterminant le nombre de substitutions nucléotidiques nécessaires pour passer d'un génome à l'autre. Il est évident que la proche parenté entre les virus d'un même groupe n'est pas le fruit du hasard mais qu'elle représente une histoire évolutive commune.

Cette classification en cinq groupes pose cependant plusieurs problèmes : les virus humains VIH-1 et VIH-2 se retrouvent dans des groupes distincts de même que les virus infectant les singes verts et les sykes alors que ces deux espèces sont phylogénétiquement proche.

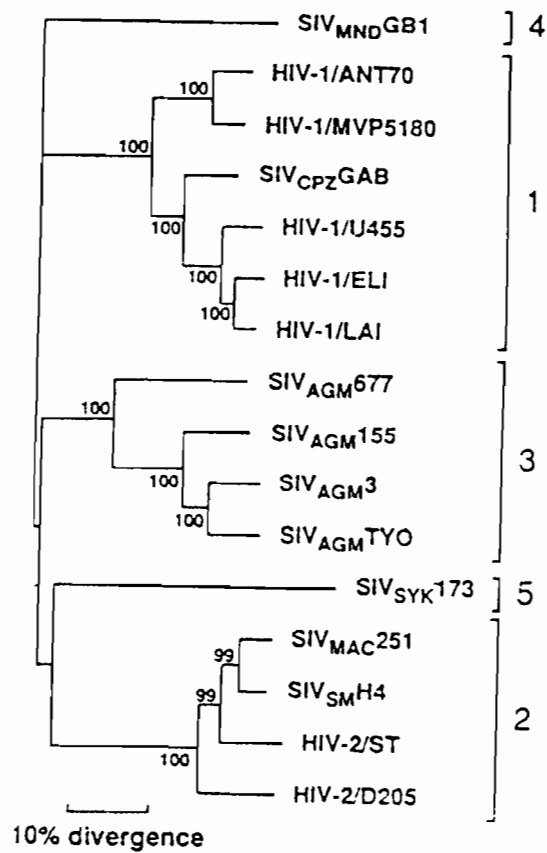


Figure 15 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des protéines Pol des lentivirus de primates indiquant la présence de cinq groupes évolutifs distincts (D'après Sharp et coll., 1994).

## VII Origine du VIH

Dès 1984, il est apparu que le SIDA était présent en Afrique centrale, en particulier au Zaïre depuis plusieurs années (Benn et coll., 1985). L'infection la plus ancienne a été datée de 1959 (Nahmias, et coll., 1986) alors que les premiers cas américains sont apparus au début des années 80. Cela a suggéré une origine africaine du virus. En effet, l'analyse moléculaire d'isolats de VIH-1 provenant d'Afrique a montré qu'ils présentaient entre eux des différences génétiques très importantes, supérieures à celles observées entre les isolats américains et européens. Cette divergence suggère une présence plus ancienne dans la population africaine (Sharp et coll., 1994). De plus, les souches VIH-1/O sont très divergentes des souches les plus répandues actuellement (VIH-1/M) et l'analyse génétique des souches du groupe O suggère que ces virus pourraient être plus anciens que les souches du groupe M (Loussert-Ajaka et coll., 1995).

Les deux hypothèses les plus sérieuses sont :

- 1- celle d'une origine animale du virus,
- 2- celle d'un virus humain ancien, préexistant dans certaines populations.

Les résultats actuels semblent confirmer l'origine simienne dans le cas du VIH-2. En effet, l'analyse phylogénétique a montré que le VIH-2 est très proche des souches SIV infectant le mangabé (SIV<sub>sm</sub>). De plus, certaines souches SIV<sub>sm</sub> ont plus d'homologie avec le VIH-2 qu'avec d'autres souches SIV<sub>sm</sub> (Hirsch et coll., 1989; Marx et coll., 1991; Peeters et coll., 1994; Chen et coll., 1996). Ces souches simiennes partagent avec les souches VIH-2 le gène vpx, qui est absent chez les autres souches de primates. Enfin, le VIH-2 est prédominant en Afrique occidentale qui est l'habitat naturel des mangabés. Il est probable que les différents sous-types du VIH-2 proviennent de plusieurs transmissions interspécifiques à partir de mangabés (Gao et coll., 1994). L'origine du VIH-1 reste plus hypothétique, des études indiquent que les souches du groupe M

proviendraient toutes d'un ancêtre commun qui aurait évolué différemment selon le type d'hôte rencontré (Korber et coll., 1994b).

L'origine simienne récente du SIDA a été contestée par d'autres équipes. Le seul primate chez lequel on observe une variabilité considérable du virus est l'Homme lui-même. Aucune espèce de singe ne possède deux types distincts de virus comme VIH-1 et VIH-2; ceci suggère que l'Homme est un réservoir ancien du virus. On suppose que le virus est resté longtemps confiné dans des populations plus ou moins isolées, ne causant qu'une faible mortalité. Le déséquilibre écologique dû aux bouleversement sociologiques récents survenus en Afrique (exode rural, urbanisation massive...) a entraîné l'apparition de deux foyers indépendants du SIDA : VIH-1 en Afrique centrale et VIH-2 en Afrique occidentale.

# Présentation du travail

---

Le travail de thèse au sein du laboratoire a porté sur l'étude des caractéristiques virologiques et moléculaires des infections VIH-1 survenues lors d'un séjour Outre-mer.

Depuis la découverte des virus VIH-1 et VIH-2 comme agents responsables du SIDA, plusieurs études ont permis d'analyser les caractéristiques moléculaires et les mécanismes d'expression des gènes de ces virus ainsi que leurs complexités génomiques (Meyers et coll., 1995). Il en découle une grande variabilité génétique au sein de cette classe de virus. L'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'enveloppe du VIH-1 a révélé l'existence de deux groupes. Le groupe M, qui comprend 9 sous-types génétiquement différents (A-I) (Meyers et coll., 1995) et le groupe O dans lequel sont présents les souches les plus divergentes, principalement observées au Cameroun ou chez des patients originaires du Cameroun (Charneau et coll., 1994; Loussert-Ajaka et coll., 1995). L'impact de ces différents sous-types de virus sur la pathogénèse, le développement de la maladie et la transmission virale reste à élucider. Afin de déterminer l'histoire naturelle du virus d'une part, et d'autre part, de suivre l'épidémie causée par le VIH dans le monde, il devient nécessaire de recenser

et de classer un maximum de souches des différents sous-types. Récemment, il a été suggéré qu'en Thaïlande le génotype E pouvait être associé à un risque de transmission hétérosexuelle plus élevé que le génotype B; la prédominance du génotype E pourrait avoir contribué à la diffusion rapide du VIH-1 dans ce pays (Kunanusont et coll., 1995). La variabilité génétique peut donc avoir un rôle sur la dynamique de l'infection, et également avoir un effet sur la sensibilité des tests commercialisés pour le diagnostic (Loussert-Ajaka et coll., 1994) ainsi que sur la résistance naturelle vis-à-vis de médicaments anti-VIH (Descamps et coll., 1995). Enfin, la diversité génétique des virus VIH-1 a des implications pour le développement de vaccins élaborés à partir d'une souche virale (ou sous-type), dans la mesure où un prototype vaccin basé sur un seul type de virus pourrait ne pas entraîner une réponse immune suffisamment large pour protéger contre les virus des autres sous-types.

Jusqu'à présent la plupart de notre connaissance de l'histoire naturelle de l'infection à VIH-1 est liée au génotype B, dans la mesure où les études ont été faites sur des cohortes en Europe ou aux Etats-Unis.

A la suite d'un séjour Outre-mer et en dépit d'efforts intensifs de prévention, près de 200 militaires français ont été contaminés par le virus VIH-1 entre 1986 et 1996. Ces patients ont séjourné dans des pays où le génotype B est rare et où des génotypes divers circulent, et ont donc une forte probabilité d'être contaminé par des souches à priori non-B. Les caractéristiques virologiques de ces souches sont importantes à préciser pour ces patients et le sous-type génétique impliqué dans leur contamination présente un intérêt majeur sur le plan épidémiologique. Ces patients infectés par des souches non-B, dont la date et le lieu de contamination sont connus, ayant un suivi médical régulier donnent l'opportunité d'étudier l'histoire naturelle de l'infection VIH-1 en fonction de différents génotypes.

La première partie de ce travail a consisté à identifier les génotypes viraux impliqués dans ces contaminations Outre-mer. Les lieux de contamination sont principalement l'Afrique ( Djibouti, Tchad, Côte-d'ivoire, Gabon) et l'Asie (Cambodge). L'objectif a été de déterminer les sous-types du VIH-1 "importés" en France et d'évaluer la diversité existante entre ces souches. Cette étude nous a permis d'identifier différentes souches non B, et de mettre en évidence une grande divergence entre les souches du sous-type A, C et B.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les caractéristiques virologiques des différents isolats afin de déterminer :

- la corrélation entre les phénotypes biologiques et la progression de l'infection pour les différents génotypes d'une part, et le stade clinique du patient d'autre part.
- la corrélation entre les propriétés génétiques et les propriétés biologiques pour les différents sous-types.

## Partie I

---

# Etude des caractéristiques moléculaires de l'infection à VIH-1 survenue Outre-mer

### I L'objectif:

Identifier les différents génotypes et les caractéristiques génétiques des souches VIH-1 impliquées dans les contaminations Outre-mer.

### II Population étudiée et méthodes:

61 patients détectés positifs pour l'infection à VIH-1 entre 1986 et 1995 dans l'armée Française ont été inclus dans l'étude. Pour chaque patient, l'année et le pays de contamination sont connus. Pour l'ensemble des patients, le génotype a été identifié dans un premier temps par la technique de l'HMA pour "Heteroduplex Mobility Assay" en utilisant ED5/ED12 comme amorces externes et ES7/ES8 comme amorces internes. Cette technique a été effectuée

technique a été effectuée sur la région V3-V5 de la gp120 de l'enveloppe. Pour obtenir plus d'informations moléculaires, la région C2V3 de la gp120 a été séquencée et une analyse phylogénétique a été réalisée. Les séquences en acides aminés correspondant à la région V3 ont été alignées puis comparées à la séquence consensus de la région V3 correspondant à chaque sous-type.

### **III Résultats**

Parmi les 61 patients, 9 étaient déjà positifs par VIH-1 au dépistage effectué systématiquement avant le départ Outre-mer. Les souches isolées de ces patients étaient toutes de sous-type B. Les 52 autres étaient négatifs avant leur départ, mais positifs au dépistage anti-VIH effectué à leur retour. La majorité de ces patients (33/52) avaient travaillé à Djibouti, les autres étaient en service au Cambodge, Cameroun, République Centrafricaine, Côte d'Ivoire, Gabon, Guyane, Mayotte et Tchad. Parmi ces 52 patients, nous avons observés que 8 (15.3%) sont infectés par le sous-type A, 20 (38.5%) par le sous-type B, 16 (30.7%) par le sous-type C, 1 (1.9%) par le sous-type D, 6 (11.5%) par le sous-type E, et 1 (1.9%) par le sous-type F. Tous les patients infectés avec le sous-type C ont travaillé à Djibouti. Pour les 6 sous-types E, 5 ont été contaminés au Cambodge et 1 à Djibouti. Les infections avec les sous-types B sont survenues après des séjours à Djibouti (n=11), Cameroun (n=1), Guyane (n=3), Tchad (n=2), Gabon (n=1), Mayotte (n=1) et Côte d'Ivoire (n=1). Les séquences et l'analyse phylogénétique de ces souches ont montré que la divergence de ces souches au sein d'un même sous-type est relativement importante : 16.4% (6.3 - 21.3%) pour le sous-type A, 15.6% (7.4 - 22.0%) pour le sous-type B, 14.8% (6.3 - 21.0%) pour le sous-type C et 5.5% (3.1 - 10.8%) pour le sous-type E. L'analyse phylogénétique fait apparaître aussi 2 sous groupes parmi les souches des sous-types A et C. Les souches du sous-type B, ainsi que les souches des sous-types A et C forment des groupes très hétérogènes. L'analyse des séquences d'acides

aminés de la boucle V3 montre que chez les souches du sous-type B, on retrouve le motif GPGR prédominant, alors que pour tous les autres sous-types c'est le motif GPGQ. Cependant, on observe des motifs divergents, entre autre parmi les souches du sous-type B, où pour certaines, le motif GWGR décrit uniquement sur des souches Brésiliennes est retrouvé sur deux isolats provenant de 2 patients contaminés à Djibouti. On observe également le motif GLGR sur une souche du sous-type B du Cameroun. Ce motif est seulement présent sur 8 des 967 séquences de la boucle V3 connues et plus spécifiquement aussi sur une souche Camerounaise du sous-type F. Enfin, pour la première fois, nous avons observé une souche du sous-type C ayant le motif GPGR.

## **VI Conclusion**

Ces résultats montrent que la prédominance des souches du sous type B pourrait potentiellement se modifier en France, car dans la population que nous avons étudié, 33/52 patients étaient contaminés par une souche non-B. Cependant, l'impact sur l'épidémie en France reste à étudier, car ces patients ne représentent qu'une minorité de la population infectée par le VIH-1 en France. Ils montrent aussi que les différentes souches de sous-type A, B et C sont très divergentes. La population étudiée constitue une très bonne base pour initier une cohorte afin de définir l'impact des différents génotypes sur l'évolution de l'infection à VIH-1.

**Presence of multiple non-B subtypes and divergent subtype B strains of HIV-1 in individuals infected after overseas employment.**

Lasky Mariama<sup>1</sup>, Perret Jean-Luc<sup>2,3</sup>, Peeters Martine<sup>1\*</sup>, Bibollet-Ruche Frédérique<sup>1</sup>, Liegeois Florian<sup>1</sup>, Patrel Delphine<sup>1</sup>, Molinier Sylvain<sup>2</sup>, Gras Christian<sup>2,3</sup>, Delaporte Eric<sup>1</sup>.

Sous presse à AIDS

---

<sup>1</sup> Laboratoire Retrovirus, ORSTOM, Montpellier, France.

<sup>2</sup> Hôpital d'Instructions des Armées (HIA), Laveran, Marseille, France

<sup>3</sup> Institut de Médecine Tropicale des Services de Santé des Armées (IMTSSA), Marseille, France.

\* corresponding author and address : Martine Peeters , Laboratoire Retrovirus, ORSTOM, 91 Avenue Agropolis, BP5045, 34032 Montpellier cedex 1, France.

tel: 33-67 61 75 58

fax:33-67 54 78 00 / 33-67 61 74 56

## SUMMARY

**Objective:** to identify the genetic subtypes and genetic characteristics of HIV-1 strains from individuals infected after overseas deployment.

**Patients and methods:** 61 HIV-1 positive individuals detected between 1986 and 1995 in the French army were included in the study. For each patient the year and country of HIV infection are known. Genetic subtypes of HIV-1 were determined with the heteroduplex mobility assay using ED5/ED12 as outer and ES7/ES8 as inner primers. Strains were further characterized by sequencing and phylogenetic analysis of the C2V3 region. The amino acid sequences corresponding to the V3 region were aligned on the basis of the subtyping results and were then compared to the consensus V3 sequences of the corresponding subtypes.

**Results:** Among the 61 patients studied, 9 became infected in France and 52 were HIV negative before overseas deployment but HIV positive at their return. The majority (n=43) deployed in Africa and a limited number of patients deployed in Asia (Cambodia, n=5) or Southern America (Guayana, n=4). The 9 individuals who did not deploy overseas were all infected with subtype B strains. The majority of the other patients were infected with non-B strains; 8 subtype A, 20 subtype B, 16 subtype C, 1 subtype D, 6 subtype E and 1 subtype F. Five of the 6 subtype E strains were contracted in Cambodia and 1 in Djibouti, and all subtype C strains were from Djibouti. Phylogenetic analysis revealed a large diversity among the different strains introduced into France. Analysis of the amino-acid sequences of the V3 loop revealed the introduction of uncommon V3 loop patterns.

**Conclusion:** In the group of HIV-1 infected individuals that we studied and who deployed overseas 63.4% were infected with non-B strains. In addition, the subtype A, B and C viruses in this population were very heterogeneous. Due to the routine occurrence of international travel and deployment, in European countries the predominance of subtype B HIV-1 viruses may change. However, the possible implications on the dynamics of the HIV-1 epidemic needs further follow-up.

## INTRODUCTION

Since the discovery of HIV-1 and HIV-2 as causative agents of the acquired immune deficiency syndrome, much has been learned on their molecular characteristics, mechanisms of gene expression, and genomic complexity. Multiple isolates of both viruses have been characterized, their genomes cloned and their nucleotide sequences determined (1). From these studies we know that genetic variation is a hallmark of this class of viruses, no two viruses are alike, and even within a single individual HIV is present as a quasispecies (2). With the recent characterization of many isolates of HIV from Africa and from other regions of the world, a phylogenetic structure has emerged that identified numerous subtypes of the virus. This phylogenetic analysis revealed two groups of HIV-1 isolates, group M, the major group, with at least 10 different genetic subtypes (A-J), and group O (1,3). HIV-1 group O viruses are highly divergent HIV-1 viruses and are mainly found in Cameroon or among Cameroonians (4,5,6). The geographical distribution of the different HIV-1 genetic subtypes is not well known, since relatively few systematic large scale attempts to characterize HIV isolates from different parts of the world have been done. Preliminary data indicate a very heterogeneous distribution and dominance of different genetic subtypes depending on the country analyzed. Subtype B, which includes the prototype strain (HIV-1<sub>la</sub>) is dominant in Europe and North America (1) In Africa, all the known HIV-1 genetic subtypes, including group O, are present and in South-East Asia subtype E is predominant (7-13).

The relevance of this subtype classification versus the pathogenesis, disease progression and virus transmission is not yet fully understood. HIV-1 subtypes may have effects on the sensitivity of diagnostic assays and natural resistance against anti-HIV drugs (14). Some data suggest that the genetic heterogeneity of

HIV-1 has immune relevance (15), therefore there is concern that vaccine products based on subtype B may not generate broad enough immunity to protect against the other subtypes that occur around the world. Given the wide dispersal of HIV-1 subtypes internationally, and the occurrence of international travel, it is inevitable that strains other than subtype B will spread in Europe and the USA. Recently the introduction of A, D and E genotypes into the USA by 5 individuals of the US army personnel after overseas deployment was reported (16). Also in Germany, in 9 new HIV infected patients 3 were subtype E, and 1 was subtype C (17). It is important to monitor the different genetic subtypes that are introduced in the population in order to study whether the introduction of non-B genetic subtypes could influence the actual epidemic or not.

In order to contribute to an evaluation on the importance of HIV-1 infections with non B subtypes in France we analyzed the HIV-1 genetic subtypes and risk factors associated with HIV infection in military people selected for overseas duties. We focused on this population group because they undergo regular medical visits and the country and period of overseas employment are well documented, allowing a better analysis of factors associated with presence of certain HIV-1 genetic subtypes.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients**

We analyzed the risk factors and possible contamination sites in 61 HIV-1 positive individuals from the French army. Since 1987 the army personnel that is selected for overseas deployment is screened for HIV infection in the year that they are supposed to leave, i.e. between 0 and 6 months before their real departure. People are retested for anti-HIV antibodies within a period of 3

months after their return to France. By this way, for each patient the year and the country of infection are known with a high probability. When the HIV test is positive, patients are informed and they undergo medical visits at regular time intervals.

### **Virus isolation**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the HIV positive patients were co-cultivated with PHA-stimulated lymphocytes from a healthy (HIV-negative) human donor in RPMI 1654 medium supplemented with 15% heat inactivated foetal calf serum, 0.03% L-glutamine, 2ug/ml polybreen, antibiotics and 20 U/ml recombinant Interleukin-2 (Boehringer, Mannheim, Germany). The culture flasks were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The medium was replaced every 3 to 4 days, and once a week fresh PHA stimulated donor lymphocytes were added. The cultures were kept for 6 weeks. The release of viral particles in the culture supernatant was examined by an HIV p24 antigen capturing test (Innogenetics, Antwerp, Belgium).

### **DNA preparation and PCR**

DNA was extracted using the IsoQuick isolation kit (Microprobe Corp, Garden Cove, CA,USA) from cultured PBMCs or primary lymphocytes when viral isolations were negative. A nested PCR technique was used to amplify viral genomic regions for HMA and sequencing. For HMA, we used as outer primers ED5-ED12 and as inners ES7-ES8, which have been described elsewhere (18). From 0.5 to 1.0 ug of genomic DNA was used under the following conditions: a first denaturation step for 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 94°C for 15 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 2 min, with a final extension for 7 min at 72°C for the first round. Three microliters from this amplification were used for the second round with the inner primers using

the same cycling conditions for 40 cycles. The reaction mixture consists of 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH=9), 0.1% Triton X 100, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, and 2.5 U Taq polymerase. For sequencing, amplifications were performed on the same starting material with previously described primers, ED31/ED33 for the outers (31) and BH1E101 (biotinylated) (5' CTGTTTAATGGCAGTCTAGCAGA 3') and V4 (5'CAGTAGAAAAATTCCCC 3') for the inners. Cycling conditions were as follows: for the first round 3 cycles of 94°C for 1 min, 37°C for 1 min and 72°C for 1 min were followed by 32 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min with a final extension of 7 min at 72°C. For the second PCR round 25 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 44°C and 1 min at 72°C were done with a final extension of 7 min at 72°C. The reaction mixture consists of 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH=9), 0.1% Triton X 100, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, and 2.5 U Taq polymerase. The PCR amplification products were detected by electrophoresis on a 1% agarose gel and visualised by ethidium bromide staining.

### **Heteroduplex formation (HMA)**

Heteroduplex molecules were obtained by mixing two divergent PCR-amplified DNA fragments (the unknown patient strain with a plasmid from typed reference strains) denaturated at 96°C for 3 min and renaturated by rapid cooling on wet ice. The reference strains used in this study were the following: A1 (RW20, Ruanda), A2 (IC144, Ivory Coast), A3 (SF170, Ruanda), B1 (BR20, Brazil), B2 (TH14, Thailand), B3 (SF162, USA), C1 (MA959, Malawi), C2 (ZM18, Zambia), C3 (IN868, India), C4 (BR25, Brazil), D1 (UG21, Uganda), D2 (UG38, Uganda), D3 (UG46, Uganda), E1 (TH22, Thailand) E2 (TH06, Thailand), E3 (CAR7, Central African Republic), F1 (BZ162, Brazil), F2 (BZ163, Brazil), G1 (RU131, Russia), G2 (LBV21-7, Gabon), G3 (VI525, Gabon), H1 (CA13,

Cameroon), H2 (VI557, Zaire), H3 (VI997, Belgium). The reaction was performed in 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl (pH 7.8) and 2 mM EDTA in a final volume of 8 ul. The heteroduplex formation was resolved by electrophoresis analysis at 250 V for 3 hr on a nondenaturing 5% polyacrylamide gel in TBE buffer (88mM Tris borate, 89mM boric acid, 2 mM EDTA) and was detected after being stained with ethidium bromide. The electrophoretic mobility of the heteroduplexes was inversely proportional to the sequence divergence of the two annealed strands.

### **DNA sequencing**

Amplified products were purified by immobilisation on streptavidin coated magnetic beads (Dynabeads M280-streptavidin ,Dynal AS, France). Both strands were separated by denaturation with NaOH and were purified separately. Sequencing primers were H1E101 ( 5'AATGGCAGTCTAGCAGAA 3') (forward) and H1E203 ( 5'GTAATTTCTAAATCCCCTCCTGAG 3') (reverse). Cycle sequencing was performed using fluorescent dye terminator technology (dye terminator cycle sequencing with AmpliTaqR DNA polymerase FS, Perkin Elmer) according to the instructions of the manufacturer. Electrophoresis and data collection was done on an Applied Biosystems 374 automatic DNA sequencer.

### **Phylogenetic analysis**

Nucleotide sequences were aligned by using Clustal V (19) program with minor manual adjustments considering their predict proteine sequence. Regions that could not be aligned unambiguously, due to length or sequence variability, were omitted from the analysis. The newly determined C2V3 nucleotide sequences were aligned with known HIV-1 sequences representing different genetic subtypes and the sequence of SIVcpz-gab. The previously

reported HIV-1 sequences are the following: CA5, LAI, and MN for subtype B; NDK and ELI for subtype D; U455 and KE 89 for subtype A; BZ-126AC for subtype F; ZAM20, NOF and DJ2591 for subtype C; CAR4017.2 and TN2432 for subtype E. Evolutionary distances were computed using Kimura's empirical two-parameter period. A distance matrix was then used to estimate phylogenetic relationships by the neighbourjoining method (20) . Reliability of the branching orders was confirmed by the bootstrap approach (21). All analyses were performed using CLUSTAL V (22).

## RESULTS

### Population studied

A total of 61 HIV positive individuals were studied. All these persons were selected for overseas deployment and were tested for HIV antibodies in the year that they are supposed to leave overseas. Among the 61 individuals, 9 tested positive for HIV antibodies (screening by Elisa and confirmation by Western blot) at this initial visit and were therefore not allowed to deploy overseas. Since their test was positive at the screening visit and based on their epidemiological history they most probably became infected with HIV in France. None of them had a history of intravenous drug use or transfusion with blood or blood derived products. The other 52 individuals were HIV negative at the initial visit but were positive when they came back to France, and therefore most probably became infected overseas. Also none of these 52 patients had a history of IVDU or blood transfusion. Table 1 summarizes for all the patients in our study, the year of infection or diagnosis , age, risk of HIV exposure, the country of overseas duty and the genetic subtype as determined by HMA and/or sequencing of the C2V3 region. For the individuals who tested positive after deployment overseas, the year of HIV diagnosis corresponds to

the year of HIV infection. The mean age for our patients was 33.5 years ranging from 26 to 54 years. The majority of the HIV infected individuals deployed in Djibouti (East-Africa) (n=33). The remaining 19 cases performed duties in Cambodia (n=5), Central Africa (Cameroon (n=1), Central African Republic (n=4), Gabon (n=1) and Tchad (n=2)), West-Africa (Côte d'Ivoire (n=1)), Mayotte (located in the Indian Ocean above Madagascar) (n=1) and French Guayana (n=4). Only one woman was included in the study, she was positive by the initial screening visit (MP 39).

### Genetic subtyping of HIV-1 strains

In order to determine the genetic subtype of the HIV-1 viruses, HMA was performed on heteroduplexes obtained by reannealing the 0.7 kb env PCR product, corresponding to the V3-V5 region, of each sample with the corresponding PCR products of the HIV-1 reference strains. All subtype assignments were based on reactions with the reference sequences. In this group of patients 6 different genetic subtypes (A,B, C, D, E and F) were identified by HMA and C2V3 sequences as shown in Table 1. Significantly more B subtypes were observed in the patients who acquired HIV-1 infection in France, 9/9 (100%) versus 20/52 (38.5%) in patients who went on overseas duty. Among the 52 patients who acquired HIV infection after overseas employment, 8 (15.3%) were infected with subtype A, 20 (38.5%) with subtype B, 16 (30.7%) with subtype C, 1 (1.9%) with subtype D, 6 (11.5%) with subtype E and 1 (1.9%) with subtype F.

All the 16 HIV-1 subtype C infected individuals employed in Djibouti. Five of the 6 subtype E infected individuals employed in Cambodia and 1 in Djibouti. Subtype A infections were acquired after employment in French Guyana (n=1), Djibouti (n=5) and Central African Republic (n=2). Subtype B infections were acquired in Djibouti (n=11), Cameroon (n=1), French Guyana (n=3),

Tchaad (n=2), Gabon (n=1), Mayotte (Comores Island)(n=1) and Côte d'Ivoire (n=1). Subtype D and F were acquired in the Central African Republic.

Since 1987 non-B HIV-1 strains are introduced into France by this population group and since then the number and the variety of non-B strains is increasing.

### **Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of the C2-V3 region**

In order to complete the qualitative analysis started by HMA analysis, approximately 260 bp (the C2-V3 region of the env gene) were sequenced directly from the PCR products. The nucleotide sequences were compared pairwise and the homology rates were obtained by alignment analysis. The nucleotide homologies were calculated and the average divergence within the different genetic subtypes is as follows: 16.4% ranging from 6.3% to 21.0% for subtype A strains, 15.6% ranging from 7.4% to 22.0% for subtype B strains, 14.8% ranging from 6.3% to 23.9% in subtype C and an average of 5.5% between 3.1% to 10.8% for type E. The highest homology was observed between the type E strains.

In order to perform phylogenetic studies, the nucleotide sequences from our study were aligned among themselves and with data bank sequences, in particular with HIV-1 sequences from the different clades (A-H) and with the chimpanzee SIVcpz-gab strain as an outlier and a phylogenetic tree was constructed (Fig 1). The genetic subtypes identified by HMA analysis were confirmed in the phylogenetic analysis. For 7 HIV-1 strains it was not possible to type them by HMA, because the amount of amplified product was too low or PCR with ES7-ES8 primers remained negative, probably due to too many mismatches between primers and target DNA. These strains were identified by the phylogenetic analysis of the C2V3 sequences as subgroup A (n=1), subgroup B (n=4), subgroup C (n=1) and subgroup E (n=1). The phylogenetic analysis of

group A and C suggests two clusters, although supported by relative low bootstrap values. The possible geographic origin of the subtype A strains is very diverse. This group includes isolates from Djibouti, Côte d'Ivoire, Central African Republic and French Guyane and the infections occurred between 1987 and 1995. The group C strains originated all from Djibouti, however the infections were acquired at different periods, between 1990 and 1995.

The group E strains formed a small cluster and there was less variability in this subtype, 5 of the 6 E strains were from Cambodia and these individuals were infected between 1992 and 1993. The only F strain obtained from a patient after deployment in the Central African Republic cluster with the reference strains from genetic subtype F. The B strains were obtained from different geographic regions and form a heterogeneous group.

### **Analysis of the V3 loop**

In order to verify the impact of the nucleotide variations on peptide composition, the V3 loop amino-acid sequences were also studied. The alignment of the deduced amino acid sequences of the HIV-1 region are shown in table 3. The amino acid sequences corresponding to the V3 region of the HIV-1 strains from our study were aligned on the basis of the subtyping results and they were compared to the consensus V3 sequences of the corresponding subtypes (data not shown). The different genetic subtypes of HIV-1 identified in our study present distinct V3 loop patterns. Only in the B subtype GPGR is the most common tip of the V3 loop, globally for the other genetic subtypes GPGQ is more prevalent. All the subtype A and E strains had the GPGQ tetramer. Among the 14 subtype C strains, 13 were GPGQ and one was GPGR. Twelve of the 16 subtype B strains were GPGR, from individuals infected in France and Djibouti. The GWGR motif was observed in 2 individuals contaminated in Djibouti and the GLGR motif in a strain most probably from Cameroon. In 6 of

the 15 subtype C strains from our study the highly conserved N-linked glycosylation site proximal to the first cysteine in the loop was present. Also in the phylogenetic tree these isolates form a separate group ( MP003, MP019, MP041, MP129, MP197 and MP098).

## DISCUSSION

Early studies in Europe noted that the first heterosexual AIDS cases were amongst travellers, expatriates and workers returning from abroad and the role of cross-border travel in the transmission of HIV was recognized soon after AIDS was first described(23). Given the wide dispersal of HIV-1 subtypes internationally and the routine occurrence of international travel, it is inevitable that HIV spreads but also that other than subtype B viruses will eventually spread in Europe and the USA.

The genetic subtypes of HIV-1 in our study were determined by the heteroduplex mobility assay (HMA) and by phylogenetic analysis of the C2V3 sequences from the envelope region. The genetic subtypes identified by HMA, were identical to those obtained by the phylogenetic analysis based on the corresponding V3 sequences. This confirms the accuracy of HMA for genetic subtyping.

This study demonstrates that other than subtype B HIV-1 strains are entering France. In the population that we studied, approximately 53% of the newly detected HIV-1 cases were non-B subtypes. Even more, in the group of HIV infected individuals who employed overseas, 32 on 52 patients (61.5%) were infected with a non-B HIV-1 strain. In addition, the HIV-1 subtype B viruses observed in this population were very heterogeneous. Two B strains from individuals infected in Djibouti showed the GWGR pattern at the tip of the V3 loop. This pattern was previously only observed in subtype B strains from Brazil and Paraguay (1). One B strain had the GPGK tetramer motif, previously

described in a limited number of B strains from Europe and the USA and in 2 A strains from Uganda and Central African Republic. One strain from a patient infected in Cameroon showed the GLGR tetramer motif, among the 967 V3 sequences from all over the world described in the Los Alamos data base (1), this motif has only been described in 6 B strains, 1E strain from Thailand and 1 F strain from Cameroun. Among the subtype C strains, one had the GPGR tetramer motif typical for B strains, this is the first C strain described with this sequence at the tip of the V3 loop. For the majority (48/55) of the subtype C strains described in the Los Alamos Data base, the highly conserved N-linked glycosylation site proximal to the first cysteine in the loop is absent, but in our study in 40% (6/15) of the C strains this glycosylation site is present. In addition, in the phylogenetic tree, these strains seem to cluster in one group. However the two clusters of subtype C strains are only supported by 65% bootstrap values and sequences of longer envelope fragments are necessary to confirm this. Divergent forms of the V3 loop may have very different biological and immunological characteristics from viruses which are similar to the consensus. In the population group that we studied the introduction of non-B strains and subtype B strains with an uncommon V3 loop motif started already in 1987.

Surprisingly, a high number of individuals became infected with subtype B strains. One of the possibilities is that they became infected with HIV in France during the period between the HIV test and their real departure, but it seems rather impossible that 38% of individuals became HIV positive during this relatively short period which varies between 0 and 6 months. French Guyana is located in South America where the majority of HIV-1 infections are subtype B. Many of the subtype B infections were contracted in Djibouti which is located at the tip of East Africa. In this small country, several western nations have an important military basis which means a rather important population of expatriates in this country. One of the possibilities is that subtype B strains

have been introduced in this community by the expatriates and that these strains circulate in certain networks of prostitutes.

The possibility exists that biological or immunological differences among HIV-1 subtypes can have implications on transmission and efficiency of vaccines. To date, studies of HIV-1 and HIV-2 have provided clear evidence of differences in transmissibility of viral strains. Prospective cohort studies have shown lower mother to child transmission rates for HIV-2 compared to HIV-1 as well as less efficient rates of sexual transmission (24-26). In Thailand, the seroconcordance in couples is significantly higher in patients infected with subtype E strains than with subtype B (27), suggesting a higher risk of heterosexual transmission for subtype E HIV-1 viruses. In vitro findings suggesting that subtype E viruses grow more efficiently in Langerhans cells from genital tract mucos than do subtype B viruses (28), raise the possibility that the enhanced transmissibility of subtype E viruses is related to an intrinsic property of subtype E. However, further epidemiological and in vitro studies are necessary to confirm or not the eventual higher sexual transmissibility of subtype E viruses. Since in France the last 3 years HIV infection is decreasing in the homosexual population but continues to increase in the heterosexual population and in intravenous drug users (29), the introduction of non-B subtypes could modify the HIV epidemic in future. This was the case in Thailand, between 1988 and 1993 the proportion of subtype E infections among injecting drug users in Bangkok increased from 2.6% to 43.8% (30,31). However the impact of non-B strains on the epidemic in France has to be analyzed more in detail and in a prospective way. The returning army personnel represents only a small proportion of the HIV infected people in France and their influence in future on changing the predominance of subtype B strains in France will be limited. A study in Belgium showed that non-B

HIV-1 subtypes have been present in Belgium for some time without any evidence of an epidemic among heterosexuals. (32)

As with diagnostic tests for HIV-1, most vaccine candidates have been based on subtype B and not on subtypes prevalent in some geographic regions. It is, however important to confirm if neutralization efficiency is strongly influenced by the degree of genetic heterogeneity predicted by the subtypes. Kostrikis et al. showed that neutralization serotypes do not directly correlate with HIV-1 genetic subtypes (33), however a more extended study is necessary to identify the exact number and nature of all neutralization serotypes of HIV-1. A vaccine developed with a subtype B strain can be less efficient in developing countries or in certain population groups in Europe which are preferentially infected with non-B strains.

.As our understanding of the significance of different genotypes and phenotypes increases, knowledge of their frequency and distribution will play an important role in a timely and effective response to the HIV pandemic. The concerns related to the genetic variability discussed above emphasize the importance to monitor the molecular epidemiology of HIV by systematically collecting isolates from different populations with various transmission risk factors to help understand the degree of genetic diversity within subtypes and what subtypes predominate in these populations. Our study together with other reports clearly documents that other than subtype B HIV-1 strains have entered the western hemisphere from Africa and Asia. Even within the subtype B strain variants have been introduced with V3 loop sequences which were previously observed in Brazilian HIV-1 subtype B strains (GWGR motif of the tip of the V3 loop). In the near future, subtypes of new HIV infections should be taken into account, to follow the natural history of the disease and the effect of antiviral therapy on the different genetic subtypes. For the population that we studied, the year of HIV infection is known and since then the individuals

undergo a regular and intensive clinical and immunological follow-up. This group of individuals forms a good basis to initiate a prospective study on the eventual impact of the HIV-1 genetic subtype on the disease progression.

### **Acknowledgements**

This study was supported by a grant from the Agence National de Recherche sur le SIDA (ANRS).

We thank Sentob Saragosti for his assistance with the phylogenetic analysis .

## References

1. Meyers G, Korber B, Hahn B, Jeang KT, Mellors J, McCutchan F, Henderson L, Pavlakis G. eds. Human Retroviruses and AIDS 1995: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, NM, Los Alamos National Laboratory, 1995.
2. Wain-Hobson S. HIV genome variability in vivo. AIDS 1989, 3 (suppl 1): S13-S19.
3. Charneau P, Borman A, Quillent C et al. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. Virology 1994, 205: 247-253.
4. Van den Haesevelde M, Decourt JL, De Leys RJ et al. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. J Virol 1994, 68: 1586-1596.
5. Gurtler L, Hauser PG, Eberle J et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroun. J.Virol. 1994, 68: 1581-1585.
6. Loussert-Ajaka I, Chaix ML, Korber B et al. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Camerounian patients living in France. J Virol 1995, 69: 5640-5649.
7. Heteroduplex mobility assay and phylogenetic analysis of V3 region sequences of human immunodeficiency virus type 1 isolates from Gulu, Northern Uganda. J.Virol 1995, 69: 7971-7981.

8. Janssens W, Heyndrickx L, Van de Peer Y et al. Molecular phylogenie of part of the env gene of HIV-1 strains isolated in Côte d'Ivoire. *AIDS* 1994, 8: 21-26.
9. Delaporte E, Janssens W, Peeters M et al. Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Gabon (1986-1994). *AIDS* 1996, 10: 903-910.
10. Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 1993,7: 769-780.
11. Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K et al. Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1577-1579.
12. McCutchan FE, Hegerich PA, Brennan TP et al. Genetic variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992, 8: 1887-1895.
13. Menu E, Thi Xuan Lien T, Lafon M et al. HIV type 1 subtype E is predominant in South Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996, 12: 629-633.
14. Descamps D, Collin G, Loussert-Ajaka I, Saragosti S, Simon F, Brun-Vézinet F. HIV-1 group O sensitivity to antiretroviral drugs. *AIDS* 1995, 8: 977-978.
15. Mascola JR, Louwagie J, McCutchan FE et al. Two antigenically distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1: viral genotype predicts neutralization serotype. *J Infect Dis* 1994, 169: 48-54.
16. Brodine SK, Mascola JR, Weiss PJ et al. Detection of diverse HIV-1 genetic subtypes in the USA. *Lancet* 1995, 346: 1198-1199.

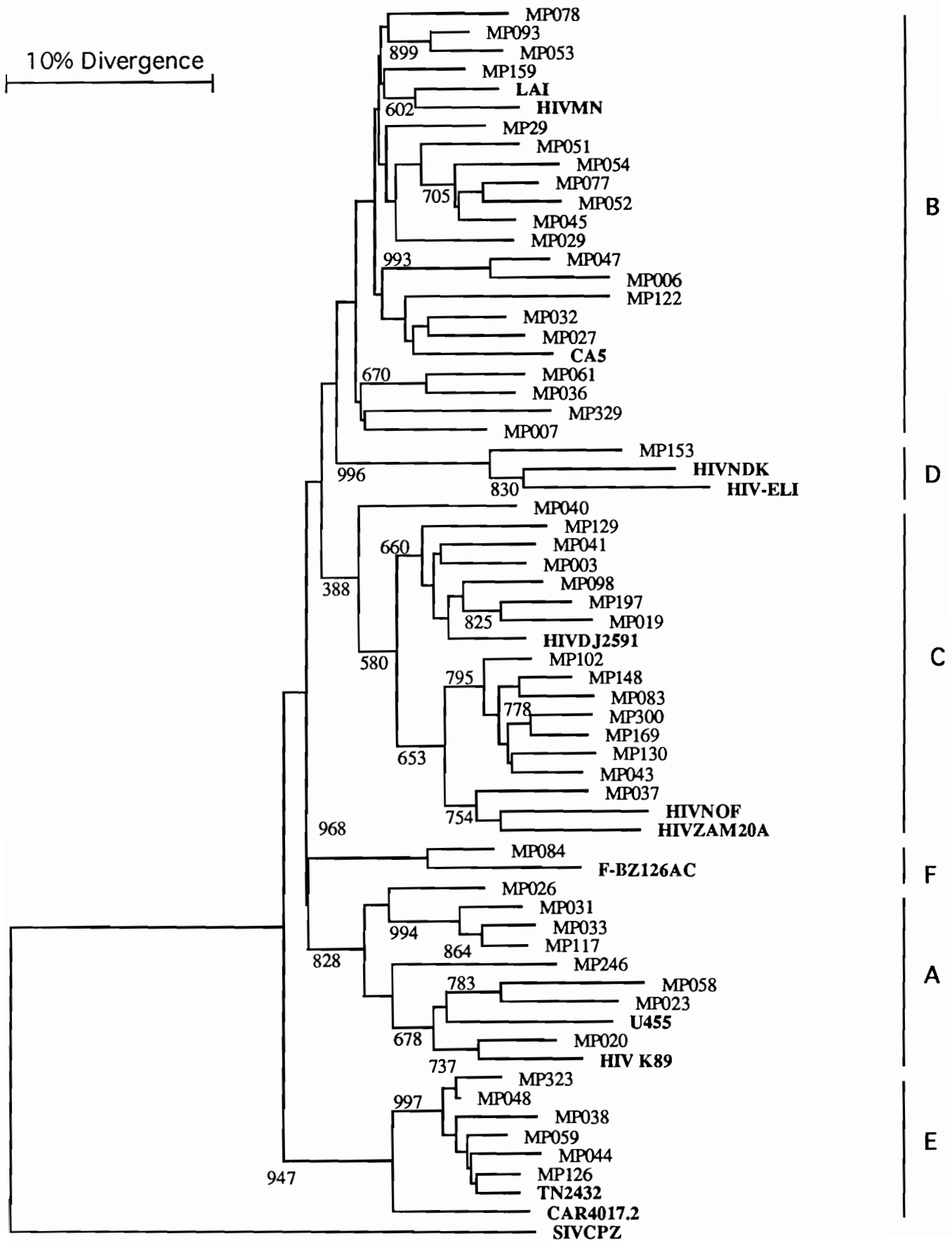
17. Ruppach H, Knechten H, Jäger H, Rübsamen-Weigmann H, Dietrich U. Risk of HIV transmission in infected US military personnel. *Lancet* 1996, 437: 697-698 (letter, reply)
18. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay; analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993; 262: 1257-1261.
19. Higgins D, Sharp P. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl Biosci* 1989, 5: 151-153.
20. Saitou N, Nei M. The neighbourjoining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987, 4: 406-425.
21. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985, 36: 783-791.
22. Higgins D, Bleasby A, Fuchs. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Appl Biosc* 1992, 8: 189-191.
23. Hawkes S, Hart GJ, Johnson AM et al. Risk behaviour and HIV prevalence in international travellers. *AIDS* 1994, 8: 247-252.
24. Kanki PJ, Travers KU, Mboup S et al. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 1994, 343: 943-946.
25. Adjorlo G, De Cock K, Ekpini E et al. Prospective comparison of mother to child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *JAMA* 1994, 272: 462-466.

26. Wittle H, Morris J, Todd J et al. HIV-2 infected patients survive longer than HIV-1 infected patients. *AIDS* 1994, 8: 1617-1620.
27. Kunanusont C, Foy HM, Kreiss JK et al. HIV-1 subtypes and male to female transmission in Thailand. *Lancet* 1995, 345: 1078-1083.
28. Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF et al. HIV-1 Langerhans cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 1996, 271: 1291-1293.
29. Surveillance du SIDA en France. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 5 mars 1996.
30. Wasi C, Herring B, Raktham S et al. Determination of HIV-1 subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand, using peptide-binding immunoassay and the heteroduplex mobility assay: evidence of increasing infection with HIV-1 subtype E. *AIDS* 1995, 9: 843-849.
31. Kalish M, Baldwin A, Ratkam S et al. The evolving molecular epidemiology of HIV-1 envelope subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand: implications for HIV vaccine trials. *AIDS* 1995, 9: 851-858.
32. Fransen K, Buve A, Nkengasong J, Laga M, van der Groen G. Longstanding presence in Belgians of multiple non-B HIV-1 subtypes. *Lancet* 1996, 347: 1403.
33. Kostrikis LG, Cao Y, Ngai H, Moore J, Ho D. Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F and I: lack of correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum dependant infectivity enhancement. *J Virol* 1996, 70: 445-458.

Table 1: Epidemiological summary from the HIV-1 infected individuals included in the study.

	Age	Year of diagnosis	Epidemiological exposure	Risk country of overseas duty	HIV-1 genetic HMA	Subtype C2V3 sequence
MP 023	38	1987	Heterosexual	Djibouti	A	A
MP 058	39	1989	Heterosexual	RCA	-	A
MP 117	34	1990	Heterosexual	Guyane	A	A
MP 020	34	1991	Heterosexual	Djibouti	A	A
MP 031	42	1992	Heterosexual	Djibouti	A	A
MP 033	36	1992	Heterosexual	Djibouti	A	A
MP 026	27	1993	Heterosexual	Djibouti	A	A
MP 246	38	1995	Heterosexual	RCA	A	A
MP 013	40	1986	Heterosexual	-	B	NT
MP 027	32	1987	Heterosexual?	Tchaad	B	B
MP 032	33	1987	Heterosexual	Tchaad	B	B
MP 122	50	1987	Heterosexual	Cameroon	B	B
MP 053	43	1988	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 006	41	1989	Heterosexual	Mayotte	B	B
MP 007	29	1990	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 029	34	1990	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 024	31	1990	Heterosexual	-	B	NT
MP 078	38	1991	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 018	31	1991	Heterosexual	-	NT	B
MP 093	32	1991	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 054	39	1992	Heterosexual	Côte Ivoire	-	B
MP 045	39	1992	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 052	36	1992	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 016	27	1992	Heterosexual	-	B	NT
MP 051	29	1993	Heterosexual?	Gabon	B	B
MP 159	23	1993	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 025	34	1993	Heterosexual	Guyane	B	B
MP 036	54	1993	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 047	33	1993	Heterosexual	Guyane	-	B
MP 039	29	1994	Heterosexual	-	B	B
MP 077	42	1994	Heterosexual??	-	B	B
MP 030	28	1994	Heterosexual	-	NT	B
MP 034	29	1994	Heterosexual	-	NT	B
MP 061	26	1995	Heterosexual	Djibouti	-	B
MP 110	41	1995	Heterosexual	-	B	B
MP 291	24	1995	Heterosexual	Guyane	-	B
MP 329	30	1995	Heterosexual	Djibouti	B	B
MP 019	40	1990	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 003	40	1991	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 040	35	1991	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 197	32	1991	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 041	31	1992	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 043	25	1992	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 130	30	1992	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 148	38	1992	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 037	28	1993	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 129	44	1993	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 169	27	1993	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 300	31	1993	Heterosexual	Djibouti	-	C
MP 098	32	1994	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 102	27	1994	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 292	24	1994	Heterosexual	Djibouti	C	NT
MP 083	32	1995	Heterosexual	Djibouti	C	C
MP 153	32	1995	Heterosexual	RCA	D	D
MP 059	31	1992	Heterosexual	Cambodge	-	E
MP 038	39	1993	Heterosexual	Cambodge	E	E
MP 044	27	1993	Heterosexual	Cambodge	E	E
MP 048	26	1993	Heterosexual	Cambodge	E	E
MP 126	26	1993	Heterosexual	Cambodge	E	E
MP 323		1995	Heterosexual	Djibouti	NT	E
MP 084	39	1992	Heterosexual	RCA	F	F

Figure 1: Phylogenetic tree based on 260 unambiguously aligned positions of the HIV-1 env gene C2V3 region from 51 new HIV-1 isolates and 13 HIV-1 reference strains representing different genetic subtypes. The tree was rooted with a corresponding region of the chimpanzee SIVcpz-gab isolate being used as an outgroup. The analysis was performed as described in Materials and Methods.



## **Partie II**

---

# **Etude du phénotype biologique du VIH-1**

### **I Introduction**

Depuis la découverte du VIH-1 et du VIH-2 comme agents responsables du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), on a beaucoup appris sur la pathogénèse de la maladie ainsi que sur les caractéristiques génétiques, biologiques, et antigéniques du virus. Ces études ont permis de mettre en évidence la caractéristique majeure de cette classe de virus : la variabilité génétique. Deux virus ne sont jamais identiques; un patient ne présente pas un seul virus mais une quantité de virus apparentés, tous dérivés les uns des autres. Ces variants distincts génétiquement sont désignés par le terme de quasi-espèces (Wain-Hobson, 1989). La caractérisation récente de nombreux isolats provenant de différentes zones géographiques a précisé les relations phylogénétiques entre ces isolats. L'analyse a permis de subdiviser ces virus en deux groupes: le groupe M (pour "Major") contenant 9 sous-types génétiquement différents (A à I), et le groupe O (pour "Outlier") dans lequel

sont regroupées les souches les plus divergentes, principalement observées au Cameroun (Charneau et coll., 1994; Loussert-Ajaka et coll., 1995). Les résultats actuels indiquent que la distribution des différents génotypes est hétérogène et que la prévalence relative de chacun des sous-types diffère selon les pays. La variabilité existe aussi au niveau des propriétés biologiques "in vitro". Ces différences biologiques telles que le tropisme cellulaire, la capacité d'induire la formation des syncytia et la capacité de répllication ont été suggérées comme déterminantes dans la pathogénèse du VIH-1 (Termette et coll., 1989; Koot et coll., 1992; Connor et coll., 1993; Connor et Ho, 1994, Richman et Bozette, 1994). Au début de la phase asymptomatique, les variants qui se répliquent très lentement sont prédominants, ils ont un tropisme pour les monocytes/macrophages et n'induisent pas la formation des syncytia sur la lignée cellulaire MT2 (Schuitemaker et coll. 1992; Cornelissen et coll., 1995). Ces variants NSI qui peuvent se développer dans les macrophages, auraient un rôle important dans la persistance virale, et permettraient au virus d'infecter certains types de tissus tel que le cerveau (Miedema et coll., 1994). Le patient peut alors évoluer rapidement vers le stade SIDA ou rester en phase asymptomatique. Au cours de l'évolution de la maladie, le taux de répllication des virus augmente (Termette et coll., 1989a; Connor et Ho, 1994), et le tropisme pour les macrophages diminue (Schuitemaker et coll. 1992). Plusieurs auteurs ont rapporté la présence de souches SI dans 50 à 60 % des cas de SIDA (Termette et coll., 1988; Koot et coll., 1992). L'apparition des variants SI est corrélée avec une diminution plus rapide du taux de cellules T CD4<sup>+</sup>, entraînant un mauvais pronostic pour le patient puisque le patient évoluera rapidement vers le stade SIDA (Schuitemaker et coll., 1992; Koot et coll., 1993a, Connor et coll., 1994). Cependant, Richman et collaborateurs ont observé que le stade final de la maladie est déterminé par le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> restant et non par le type de variants présents à ce moment de la maladie. La plupart des patients peuvent atteindre le stade final sans jamais avoir

développé de variants SI (Donaldson et coll., 1994; Kasper et coll., 1994). Certains auteurs suggèrent que le phénotype biologique du virus joue un rôle dans l'efficacité de la thérapie: l'efficacité du traitement par la Zidovudine paraît être dépendant du phénotype biologique, et l'effet bénéfique du traitement est observé chez les patients présentant des souches NSI (Koot et coll., 1993b). La classification des isolats viraux en SI ou NSI a donc été considérée par plusieurs équipes comme fondamentale dans l'évaluation des essais antiviraux (Karlsson et coll., 1994a; Richman, 1994), dans le pronostic de la progression de la maladie (Koot et coll., 1993a; Karlsson et coll., 1994b) et dans la transmission du virus (Scarlati et coll., 1993; Fiore et coll., 1994).

Les régions hypervariables de l'enveloppe du VIH-1 semblent responsables du tropisme ainsi que du phénotype biologique du virus. Plus précisément, la région V3 serait impliquée dans le tropisme du VIH-1 (O'Brien et coll., 1990; Westervelt et coll., 1992) et dans la capacité à induire la formation des syncytia (De Jong et coll., 1992; Fouchier et coll., 1994). De plus, la boucle V3 de l'enveloppe jouerait un rôle très important dans la prédiction du phénotype biologique SI ou NSI (De Jong et coll., 1992; Fouchier et coll., 1994), et la charge des acides aminés en position 11 et 25 peut prédire la présence ou non de variants SI ou NSI (DeJong et coll., 1992, Fouchier et coll., 1992, Keys et coll., 1993). En effet, la présence d'acides aminés chargés négativement ou neutres prédit des isolats NSI alors que la présence des acides aminés chargés positivement prédit des isolats SI. Cette corrélation de la séquence génétique de la boucle V3 et le phénotype peut offrir la possibilité d'avoir un test de criblage facile et rapide pour la prédiction du phénotype biologique. La classification des isolats en phénotype SI ou NSI a été considérée par plusieurs auteurs comme étant fondamentale pour l'évaluation de la progression de la maladie. Les études sur la relation entre la boucle V3 et la capacité d'induire la formation des syncytia ont été principalement réalisées pour des variants VIH-1 de sous-type B. Une quantité limitée de virus non-B a été étudiée afin de déterminer la

corrélation entre le phénotype prédit et le phénotype biologique (DeWolf et coll., 1994; Zhong et coll., 1995). Cependant, Holm-Hansen et collaborateurs ont rapporté l'absence de corrélation entre le phénotype SI/NSI et la séquence V3 chez des virus de sous-type F. En outre, les connaissances sur le phénotype biologique et sur la progression de la maladie ont été essentiellement limitées pour les virus de génotype B. Nous ne savons pas si de telles caractéristiques biologiques s'appliquent à d'autres souches appartenant à des génotypes différents.

Dans cette étude, les objectifs sont de :

- Déterminer si la corrélation entre le phénotype prédit et le phénotype biologique décrit pour les différents virus de sous-type B, existe aussi pour les autres sous-types, tel que le sous-type C pour lequel les informations sont rares.
- Analyser si l'association entre les phénotypes biologiques des infections à VIH-1 non-B est également corrélée avec une diminution des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et avec la durée de l'infection par le VIH-1 comme pour les infections du VIH-1 de sous-type B.

## **II Matériels et méthodes**

### **II.1 Patients**

82 prélèvements obtenus de 75 patients dont la plupart sont déjà décrits dans le chapitre précédant ont été étudiés. Tous ces patients sont des militaires français contaminés par le VIH-1 lors d'un séjour outre-mer. Parmi ces prélèvements, 11 sont de sous-type A (13,41%), 42 de sous-type B (51,2%), dont 4 correspondent au suivi, 19 de sous-type C (26%), 9 de sous-type E (10,9%), dont 3 correspondent au suivi, et 1 de sous-type F (1,23%). Ces différents isolats ont été identifiés dans le travail précédent (Lasky et coll., 1996).

## II.2 Isolement viral

Les virus sont isolés à partir des PBMCs (pour "Peripheral Blood Mononuclear Cells") de patients infectés par le VIH par coculture avec des PBMCs de donneurs de sang sains (VIH négatifs) préalablement activés par la phyto-hémagglutinine (PHA) dans du milieu RPMI 1640 complémenté avec 15% de sérum de veau foetal désactivé, 0,03% L-glutamine, 2µg/ml polybrène, antibiotiques, et 20 U/ml d'Interleukine-2 (Boehringer, Mannheim, Germany). Les cultures sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide de 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu est remplacé tout les 3 à 4 jours et une fois par semaine, 10<sup>6</sup> PBMCs de donneurs sains fraîchement stimulées à la PHA (1µg/ml) sont ajoutées. La présence de particules virales dans le surnageant des cultures est vérifiée par le test de capture de l'antigène VIH P24 (Innogenetics, Antwerp, Belgique). Les cultures sont maintenues 6 semaines.

## II.3 Caractérisation des phénotypes biologiques

La capacité d'induire la formation des syncytia est déterminée sur la lignée cellulaire MT2, comme décrit par Koot et coll.,1992. Brièvement, 10<sup>6</sup> PBMCs provenant d'une culture dont le test de capture de l'antigène VIH P24 est positif (DO p24>3) sont mis en coculture avec 2 10<sup>6</sup> cellules MT2 dans 5 ml de milieu Iscoves (Gibco) complémenté avec 10% de sérum de veau foetal inactivé, 0,03% L-glutamine, 2µg/ml polybrène, antibiotiques. La formation de syncytia est vérifiée deux fois par semaines, les cellules sont resuspendues dans 1/4 de milieu frais. L'isolat est considéré comme souche SI, si on observe des cellules géantes multinucléées au microscope inversé et si le test de capture de l'antigène VIH P24 est positif. Les cultures sont maintenues 4 semaines avant de déclarer la souche NSI.

## II.4 PCR et séquençage

Les séquences des 65 isolats ont été réalisées par séquençage direct de produit PCR comme décrit dans le chapitre précédent. Pour les sept isolats discordants, les séquences de plusieurs clones (M13) ont été effectuées.

L'ADN est extrait des PBMCs de culture en utilisant le Kit d'extraction "Isoquick" (MicroprobeCorp., GardenGrove CA, USA). L'amplification de la région C2C3 de l'enveloppe est réalisée par "Nested PCR". Le mélange réactionnel comprend 1 $\mu$ g d'ADN extrait, 20pmol d'amorces, 0,2mM de chaque dNTP, 2,5U Taq DNA polymérase (Promega), 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH=9 à 25°C), 0,1% TritonX100, et 1,4mM MgCl<sub>2</sub>. Les premières amorces utilisées dans l'enveloppe gp120 sont ED31/ED33 décrites par Delwart et collaborateurs (1993).

Les conditions de l'amplification sont les suivantes: 3 cycles avec une dénaturation à 94°C pendant 1min, une réassociation à 37°C pendant 1min, une élongation à 72°C pendant 1min, ensuite 32 cycles avec une dénaturation de 94°C pendant 1min, une réassociation de 50°C pendant 1min, et une élongation de 72°C pendant 1min, suivie d'une élongation finale de 7min. 1,5 $\mu$ l ADN de cet première réaction sont soumis à une seconde amplification de 25 cycles : dénaturation à 94°C pendant 1min, réassociation à 44°C pendant 1min, extension à 72°C pendant 1min suivie d'une extension finale de 7min. Les secondes amorces sont HE110 (5'-AATGGCAGTCTAGCAGAA-3') et V4 (5'-CAGTAGAAAAATTCCCC-3'). Les produits d'amplification sont visualisés après migration sur un gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium.

Les produits d'amplification sont purifiés avec un kit "Wizard" (PCR Preps DNA purification system, Promega). Le produit purifié est soumis à l'action de la DNA polymérase de Klenow / T4 polynucléotide Kinase dans un volume de

100µl comprenant 2U Klenow, 10U Kinase, 1mM ATP, 0,2mM dNTPs et 1X final de tampon kinase.

Le fragment à bout franc phosphorylé est inséré dans le vecteur M13 préalablement linéarisé par coupure franche (digestion SmaI), et déphosphorylé (Amersham). Des bactéries électro-compétentes *Escherichia coli* de souche XL1 sont transformées par 3 à 5µl de la ligation, puis étalées sur boîte H plate en présence de 2% Xgal et 2% d'IPTG. Après 5h de culture du phage recombinant, la présence de l'insert est vérifiée par PCR avec 10µl de culture dans les conditions décrites plus haut. Les matrices sont séquencées en utilisant le kit "Taq FS Dye Deoxy<sup>TM</sup> Terminator cycle sequencing Kit" (Applied Bio System). Les séquences sont analysées à l'aide d'un séquenceur automatique Applied Biosystems 373A DNA Sequencer. 4 à 13 clones par patients ont été analysés.

### II.5 L'analyse des séquences protéique de la boucle V3.

Les séquences protéiques de la boucles V3 sont alignées à l'aide du programme multialignement de Clustal V (Higgins et Sharp, 1989). Ensuite les phénotypes prédisant l'état SI ou NSI sont déterminés selon la méthode décrite par Fouchier et collaborateurs (1992), et par De Jong et collaborateurs (1992). Cette prédiction est déterminée par la charge électrique des acides aminés en position 11 et/ou 25 de la boucle V3.

### II.6 Numération des lymphocytes CD4<sup>+</sup>

La détermination du nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est réalisée par cytométrie de flux en utilisant un Facscan avec des anticorps monoclonaux commercialisés (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA).

### III Résultats

#### III.1 Prévalence des virus NSI dans la population étudiée

26,8% (22/82) des isolats viraux étudiés sont des souches SI sur la lignée cellulaire MT2, les 60 isolats restants (73,1%) sont des isolats NSI. Par sous-type génétique, la distribution des souches NSI est la suivante : 8/11 (72,7%) parmi les souches de sous-type A, 25/42 (59,5%) parmi le sous-type B, 6/9 (66,6%) parmi le génotype E et 100% (1/1) parmi le sous-type F. toutes les souches du sous-type C (19/19) sont NSI.

#### III.2 Prévalence des virus SI en fonction du nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et de la durée d'infection.

Pour 68 isolats obtenus à partir de 61 patients, le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> a été déterminé. L'analyse du phénotype en fonction du nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> montre l'apparition de souches SI dans 29,4% (20/68) des cas étudiés. Plus de 50% d'isolats SI (11/20) ont été isolés chez des patients dont le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est inférieur à 100 T4/mm<sup>3</sup>, 2 isolats (10%) de patients dont le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est compris entre 100 et 200 T4/mm<sup>3</sup>, 2 isolats, de patients dont le nombre est compris entre 200 et 500 T4/mm<sup>3</sup>, et 5 isolats, de patients dont le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est supérieur à 500 T4/mm<sup>3</sup> (Figure 1).

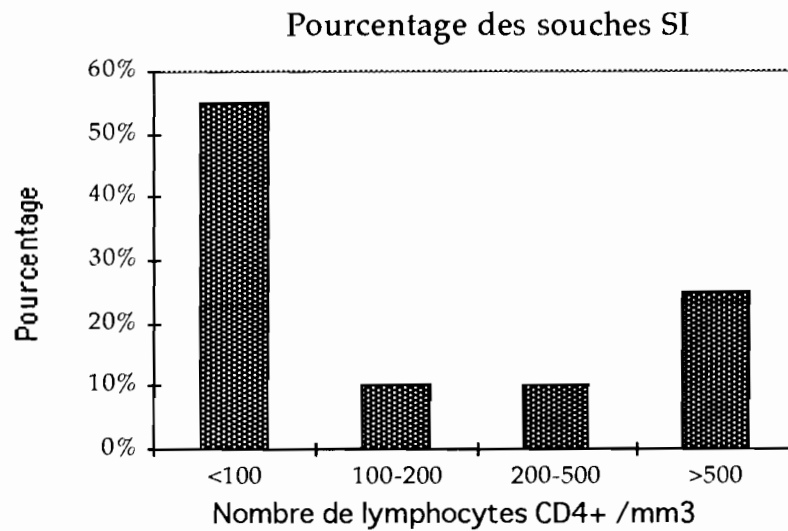


Figure 1 : Pourcentage de souches SI en fonction du nombre de lymphocytes CD4+.

La corrélation entre la présence des souches SI et le taux de lymphocytes CD4+ a été analysée en fonction des génotypes (tableau1).

Génotype	Nombre de lymphocytes CD4+ / mm <sup>3</sup>			
	<100	100-200	200-500	>500
A	2/2	0/0	0/7	0/0
B	9/14	2/4	1/10	4/9
C	0/0	0/1	0/9	0/3
E	0/0	0/1	1/5	1/2
F	0/0	0/0	0/1	0/0

Tableau 1: Nombre de souches SI en fonction du taux de lymphocytes CD4+

Pour le sous-type A, les souches SI sont présentes chez des patients dont le nombre de lymphocytes est inférieur à 100 T4/mm<sup>3</sup>, plus précisément de 2 à 32 T4/mm<sup>3</sup> (MP023 et MP114).

Pour le génotype B, les souches SI sont présentes chez des patients à différents stades de la maladie : le taux de lymphocytes CD4 varie entre 19 et 743 T4/mm<sup>3</sup>. 9/16 isolats de sous-type B sont présents chez des patients ayant un taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> inférieur à 100 T4/mm<sup>3</sup>. 7/16 isolats de sous-type B sont présents chez des patients dont le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est supérieur à 100 T4/mm<sup>3</sup>.

Parmi les 3 isolats SI de patients dont le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est supérieur à 500 on a :

- 1 patient infecté depuis juin 1993 dont le premier prélèvement était NSI (MP279).

- 2 patients infectés depuis plus de 10 ans.

Dans notre étude, les isolats SI observés chez des patients ayant un taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> élevé appartiennent aux génotypes B et E.

En ce qui concerne les souches de sous-type C, l'ensemble des isolats sont NSI. 92,3% des souches NSI sont observés chez des patients ayant un taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> compris entre 225 et 571 T4/mm<sup>3</sup>. Un seul patient (MP169) possède un taux de lymphocytes CD4 de 138 T4/mm<sup>3</sup>.

2 souches de sous-type E sont devenues SI alors que les patients ont un taux de lymphocytes CD4 élevé (460-515 T4/mm<sup>3</sup>).

La transition NSI->SI de 2 isolats de sous-type B est observée chez 2 patients (MP39, MP279) dont le taux de lymphocytes CD4 est respectivement de 4 et 576 T4/mm<sup>3</sup>. L'un des patients (MP39) est infecté depuis 1994, alors que l'autre (MP279) est infecté depuis 1993.

La durée d'infection est connue pour 58 patients. L'analyse du phénotype en fonction de la durée d'infection montre que les souches SI apparaissent au

cours de la progression de l'infection. En effet, 58,8% (10/17) des souches SI sont observées chez des patients dont la durée d'infection est supérieure à 36 mois : 3 patients infectés depuis une période de 36 à 72mois, 7 patients infectés depuis plus de 72 mois.

La corrélation entre la présence de souches SI et la durée d'infection a été analysée en fonction du génotype (Tableau 2).

Génotype	Durée d'infection en mois		
	<36	36-72	>72
A	0/4	0/3	1/1
B	5/12	2/8	6/10
C	0/8	0/7	0/0
E	2/4	1/1	0/0

**Tableau 2** : Nombre de souches SI en fonction de la durée d'infection

pour 8 de ces patients, on observe que le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est faible. Un patient dont l'apparition de souche SI est corrélée avec la durée d'infection possède un nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> de 743 T4/mm<sup>3</sup>. Ce patient infecté depuis 1986 rentre dans la catégorie des LTNP (pour "long terme non progressors").

Pour les patients ayant une durée d'infection inférieure à 36 mois. Ce groupe est constitué d'isolats de sous-types B et E.

### **III.3 Corrélation entre la capacité d'induire des syncytia et la charge des acides aminés de la boucle V3.**

La capacité d'induire des syncytia sur la lignée cellulaire MT2 a été prédite à partir de la charge électrique des acides aminés en position 11 et 25 de la

boucle V3. Cette analyse a été réalisée pour 65 souches virales. La charge positive des acides aminés en position 11 et/ou 25 est présente sur 5 des 12 souches SI avec l'arginine comme acide aminé chargé positivement. Parmi les 60 souches prédites NSI, seules 53 souches sont NSI sur la lignée MT2, soit un pourcentage de 81,5%. Les acides aminés neutres présents sont la sérine, la glycine, la glutamine, l'alanine, la méthionine. Les acides aminés chargés négativement sont l'acide aspartique et l'acide glutamique (Figure 3).

Sept souches ont été prédites NSI, mais elles induisent des syncytia sur la lignée cellulaire MT2: 2 appartiennent au sous-type A (MP023, MP114), et 5 appartiennent au sous-type B (MP053, MP093, MP122, MP319 et MP351). Pour ces souches discordantes, les séquences de plusieurs clones provenant d'un même isolat ou de l'isolat séquentiel ont été effectuées. Les résultats montrent que tous les clones prédisent un phénotype NSI (figure 4).

L'isolat séquentiel (MP432) du MP039 est discordant, du fait qu'il est prédit NSI et se retrouve SI sur la lignée cellulaire MT2.

## VIDiscussion

L'enveloppe virale, plus particulièrement la boucle V3, joue un rôle important dans le tropisme cellulaire (Shioda et coll., 1992), dans l'infectivité (Freed et coll., 1992) et dans l'effet cytopathogène du virus (Fouchier et coll., 1992). Des études longitudinales ont montré que l'évolution du phénotype viral, notamment l'augmentation de la réplication virale, la transition NSI->SI et le changement de tropisme sont associés à la progression de la maladie (Termette et coll., 1989; Koot et coll., 1992; Connor et coll., 1993; Connor et Ho, 1994). Plusieurs études ont montré une corrélation entre la structure génétique de la boucle V3 et le phénotype biologique du virus; ces études ont été réalisées pour les variants de sous-types B (DeJong et coll., 1992) et pour un nombre limité des génotypes A, D et E (DeWolf et coll., 1994; Zhong et coll., 1995). Ces études ont permis de déterminer l'existence d'une concordance entre la prédiction du phénotype à partir de la charge des acides aminés en position 11 et/ou 25 et le phénotype obtenu sur la lignée MT2. Notre étude nous a permis de déterminer l'existence d'une correspondance entre le phénotype prédit et le phénotype sur la lignée MT2, dans les cas des souches NSI avec un taux de concordance de 81,5%. Pour les souches SI, la concordance n'est que de 41,6%. Pour certains isolats, nous avons retrouvé des résultats discordants. 7 isolats prédit NSI sont apparus SI sur la lignée cellulaire MT2. Cette discordance peut être expliquée par le fait que le phénotype biologique a été réalisé à partir de coculture. En effet, les cocultures avec les PBMCs de donneurs sains peuvent sélectionner certains variants VIH-1 présents chez le patient. En lignée cellulaire MT2, le variant se répliquant rapidement (variant SI en général) est sélectionné au détriment des autres (Meyerhans et coll., 1989; Kusumi et coll., 1992). Au contraire par séquençage direct des produits d'amplification, le phénotype prédit correspond au variant majoritaire.

L'analyse des séquences après clonage n'a pas permis de lever cette discordance, nous retrouvons toujours les séquences prédisants le phénotype NSI. Le nombre de clones séquencés (4 à 13 clones) est probablement faible surtout si le variant NSI est très peu représenté. Cette discordance peut aussi être expliquée par le fait que l'analyse a été limitée à la boucle V3. En effet, plusieurs auteurs ont décrit que le phénotype SI est dépendant de la relation entre la variabilité de la séquence et la charge des acides aminés des régions V1 et V2 pour les isolats capables d'induire des syncytia (Groenink, et coll., 1993; Andeweg et al, 1993). Il est possible que les souches discordantes aient un phénotype SI sur la lignée cellulaire MT2, dicté par la région V1 et V2, alors que la boucle V3 donne un phénotype prédit NSI. Il a été montré que le domaine fusogène de la GP41 joue un rôle important dans la capacité d'induire la formation des syncytia (Delahunty et coll., 1996). De plus, d'autres phénomènes interviennent dans la capacité d'induire des syncytia, tels que la conformation de la gp120 (Stamatatos et Cheng-Mayer, 1993), l'interaction entre les régions variables V1/V2 et le domaine C4 de la gp120 (Freed et Martin, 1994). Nos résultats semblent confirmer que plusieurs régions de l'enveloppe interviennent dans la capacité du virus à former des syncytia. Il aurait été intéressant de séquencer les variants qui poussent sur la lignée cellulaire MT2. Le résultat nous donnerait avec certitude ou non l'importance de la boucle V3 à prédire le phénotype biologique.

Nos résultats montrent des différences selon les génotypes. La concordance entre les deux méthodes est de 100% pour le sous-type C et E, mais l'effectif (19 et 7) est peut être trop faible pour conclure à l'existence d'une corrélation entre le phénotype prédit et le phénotype biologique. Cette concordance a été définie pour la majorité des souches NSI avec un seul cas de souche SI appartenant au sous-type E. Nos résultats montrent aussi que pour les génotypes A et B, il est difficile de corréler définitivement la capacité d'induire des syncytia avec la présence d'acides aminés positifs en position 11 et 25 de la boucle V3. Cette

corrélation a été déterminé pour les souches B d'origine américaine et européenne. Or la majorité de nos souches de sous-type B sont d'origine Africaine et présentent une grande divergence.

Parmi les 5 souches discordantes de sous-type B, 3 sont d'origine africaine (Djibouti (n=2), Cameroun (n=1)), une d'origine française, et une d'origine indéterminée. Les deux souches de Djibouti ont le motif classique du sous-type B (GPGR). En revanche, celle du Cameroun a un motif GLGR avec deux insertions d'acide aminé en position 19 et 20 de la boucle V3. La souche française a un motif RWGR. La souche dont l'origine est inconnue a un motif GPGS. Il est probable que l'origine africaine de ces souches et les différents motifs non classiques du sous-type B puissent intervenir dans cette prédiction du phénotype surtout que les études précédentes ont été réalisées sur des souches de sous-type B d'origine américaine ou européenne (Fouchier et coll., 1992; De Jong et coll. 1992). La discordance entre le phénotype prédit et le phénotype biologique a été rapportée par différents auteurs (Scarlati et coll., 1993a; Scarlati et coll., 1993b; De Wolf et coll., 1994; Sabri et coll., 1996). De plus, Holm-Hansen et collaborateurs n'ont observé aucune corrélation entre le phénotype SI/NSI et la présence d'acides aminés chargés positivement en position 11 et 25 de la boucle V3 chez les virus de sous-type F (Holm-Hansen et coll., 1995).

Il existe donc une certaine fiabilité de la prédiction du phénotype à partir des acides aminés en position 11 et 25 de la boucle V3 dans des cas de souches NSI. Les discordances que nous avons observées dans le cas des souches SI (7/12) indiquent cependant que d'autres régions de l'enveloppe virale pourraient être impliquées dans le phénotype biologique.

Il est évident que la variabilité biologique du VIH-1 joue un rôle important dans la pathogénèse du SIDA. Dans notre étude, plus de 50% des souches SI sont observées chez les patients dont le nombre de lymphocytes CD4 est

inférieur à  $100 \text{ T4/mm}^3$ . Nos résultats concordent avec plusieurs études (Koot et coll., 1992; Schellekens et coll. 1992; Tersmette et coll., 1989). En général, l'apparition des souches SI est liée de façon significative à la diminution de lymphocytes  $\text{CD4}^+$ . Cependant, chez certains patients ayant un taux de lymphocytes  $\text{CD4}^+$  supérieur à  $500 \text{ T4/mm}^3$ , on observe l'apparition de souches SI. Nos résultats montrent que l'apparition des souches SI n'est pas toujours corrélée à un taux de lymphocytes  $\text{CD4}^+$  faible comme décrit par d'autres auteurs (Richeman et coll., 1994).

Les 2 patients présentant des souches de sous-type E devenues SI après 22 à 31 mois d'infection ont un taux de  $\text{CD4}^+$  élevé. La transition NSI->SI d'une souche B est observée chez un patient ayant un taux de lymphocytes  $\text{CD4}^+$  élevé. En revanche, la transition NSI->SI d'une autre souche B est observée chez un patient dont le taux de lymphocytes  $\text{CD4}^+$  est faible. Il semblerait que la corrélation entre le phénotype SI et la diminution des lymphocytes  $\text{CD4}^+$  dépendrait de facteurs immunologiques intrinsèques à chaque patient. L'évolution du phénotype SI est corrélée à une durée d'infection supérieure à 36 mois dans 69,2% des cas. En revanche, on a observé 30,7% des isolats SI chez des patients dont la durée d'infection est inférieure à 36 mois. Ces isolats sont tous de sous-type B. Ces résultats suggèrent que l'apparition des souches SI est associée aux propriétés virales d'une part et à l'état immunologique du patient d'autre part.

Ces résultats préliminaires montrent la nécessité de poursuivre cette étude sur un grand nombre de patients pendant une longue durée afin d'évaluer la progression de la maladie en fonction du phénotype biologique. Ces études à long terme pourraient préciser le rôle des phénotypes biologiques dans le pronostic de la maladie pour les différents génotypes.

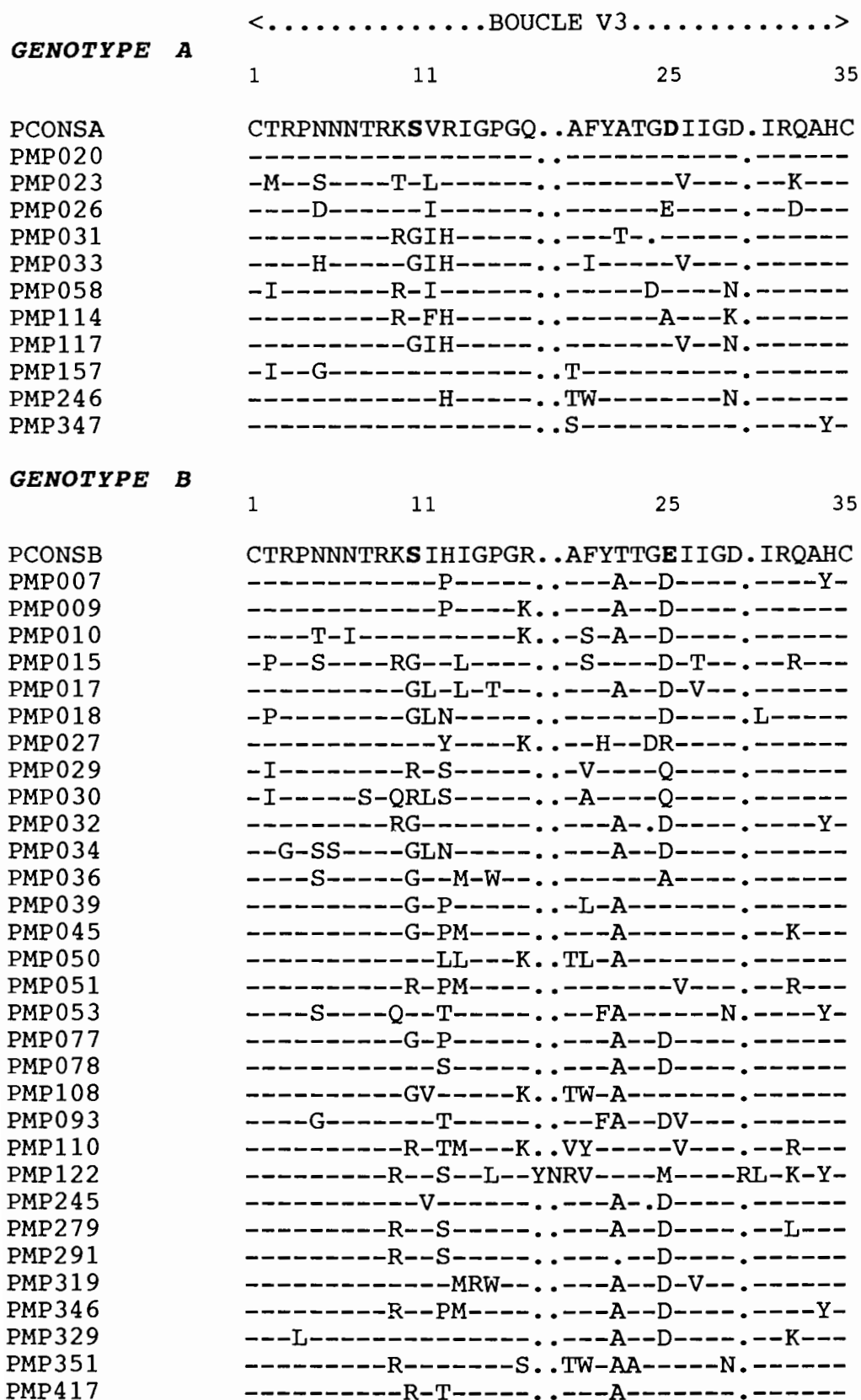


Figure 3 : Alignement des séquences protéiques de la boucle V3 obtenues par séquençage directe

<.....BOUCLE V3.....>

**GENOTYPE C**

	1	11	25	35
PCONSC	CTRPNNNTRKS IRIGPGQ..TFYATGDIIGDIRQAHC			
PMP003	-----			
PMP019	---G---E-----			
PMP037	---S-----A---NG---A---			
PMP040	---G---V-M---R-----			
PMP041	---H-----			
PMP043	-----V-----			
PMP083	-----M-----Y-			
PMP098	---G---E-----L---			
PMP102	-----M-----			
PMP116	-----R-M-----			
PMP129	---G-----			
PMP130	-----R-V-----A---			
PMP148	---G---M-----A---			
PMP169	-I--G---V-----K-Y-			
PMP197	---Y---Q-----K---			
PMP292	-----R-M-----Y-			
PMP333	-----H-G---A---A---N-E---			
PMP348	-----A---EAV--N--H-Y-			

**GENOTYPE E**

	1	11	25	35
PCONSE	CTRPSNNTRTS ITIGPGQ..VFYRTGDIIGDIRKAYC			
PMP038	-----E---V-R---			
PMP044	-----M-----			
PMP048	-----P-----			
PMP126	-I-----R--T-----			
PMP323	-----M-----			
PMP349	-----K-----F-			

**GENOTYPE F**

	1	11	25	35
PCONSF	CTRPNNNTRKS IHLGPGQ..AFYATGDIIGDIRKAHC			
PMP84	-----G-----R---			

Figure 3 : Alignement des séquences protéiques de la boucle V3 obtenues par séquençage direct.

```

<-----Boucle V3----->
1           11           25           35
PMP23*      CMRPSNNTRTSSLRIGPGQAFYATGDVIGDIRKAHC
PMP23C6     --G-----I-----
PMP23C8     -----I-----
PMP23C14    -----S-----I-----
PMP23C3     ---I-----
PMP23C4     -----I-----
PMP23C10    -----I-----K-----
PMP23C18    -----I-----
PMP23C21    -----I-----Q-----
PMP23C22    -----V---R-AIT-----
PMP23C20    -----V---R-AIT-----

1           11           25           35
PMP53*      CTRPSNNTRQSITIGPGRAFFATGEIIGNIRQAYC
PMP53C3     -----K-----
PMP53C4     ---L---R-----S-----H-
PMP53C11    -----KG-P-----D-----
PMP53C12    -----K-----
PMP53C13    -----K-----
PMP53C14    -----K-----M-----
PMP53C16    -----R-----
PMP53C19    ---L---R-----S-L---H-
PMP53C20    -----Y-E-----L-----
PMP53C21    -----Y-K-S-V-----L-----
PMP53C22    -----Y-K-----L-----
PMP53C17    -----K-----
PMP53C15    -----K-----

1           11           25           35
PMP93C2     CTRPGNNTRKSITIGPGRAFFATGDVIGDIRQAHC
PMP93C5     -----IL-----
PMP93C31    -----YT--QI-----
PMP93C30    -----YT-----
PMP93C4     -----Y---QI-----

1           11           25           35
PMP114*     CTRPNNNTRRSFHIGPGQAFYATGAIIGKIRQAHC
PMP114C3    -----
PMP114C9    -----I-----E-----
PMP114C12   ---T-S---L-----L-----
PMP114C16   -P--H-D---I-----L-----
PMP114C11   -P--H-D---I-----I--VV--PS--
PMP114C13   -----L---M-----
PMP114C20   -----I-----
PMP114C19   -----I-----
PMP114C17   -----S---I-----L-----
PMP114C21   -----L-----

```

Figure 4 : Alignement des séquences protéiques de la boucle V3 des différents clones

```

<-----Boucle V3----->
1           11           25           35
PMP319*    CTRPNNNTRRS IHMRWGRAFYATGD IVGDIRQAHC
PMP319C28  -----
PMP319C26  -----G-----
PMP319C23  -----
PMP319C22  -----
PMP319C25  -----
PMP319C16  -----V-----
PMP319C13  -----T-----

1           11           25           35
PMP351*    CTRPNNNTRRS IHIGPGSTWYAAGE IIGNIRQAHC
PMP351C1   ---T-Y-G-----C-----L-----
PMP351C2   -----L-----
PMP351C5   -----
PMP351C6   -----
PMP351C8   -----

1           11           25 28           38
PMP122*    CTRPNNNTRRS ISIGLGRYNRVYTTGMIIGDRLRKAYC
PMP399C1   -----K-----
PMP399C3   -----S-M-----V---.I-----
PMP399C5   -----K-----
PMP399C7   -----S-M-----V---.I-----
PMP399C11  -----S-----V---.I-----
PMP399C12  -----S-M-----V---.I-----
PMP399C15  -----S-A-----MLR-A-
PMP399C16  -----M-----C-
    
```

\*Séquences obtenues par séquençage directe du fragment PCR

Figure 4: Alignement des séquences protéiques de la boucle V3 des différents clones.

ISOLAT	Année d'infection	Durée d'infection en mois	Nombre lymphocyte CD4+	SOUS-TYPE par HMA et/ou C2V3 SEQ	PHENOTYPE prédit	PHENOTYPE BIOLOGIQUE	PHENOTYPE PREDIT APRES CLONAGE
MP 246	oct-94	6	ND	A	NSI	NSI	
MP 026	avr-93	21	376	A	NSI	NSI	
MP 031	oct-92	24	412	A	NSI	NSI	
MP 033	oct-92	30	234	A	NSI	NSI	
MP 020	avr-91	45	244	A	NSI	NSI	
MP 042	oct-90	60	262	A	NSI	NSI	
MP 058	nov-89	66	451	A	NSI	NSI	
MP 023	avr-87	96	2	A	<i>NSI</i>	<i>SI</i>	10 CLONES NSI
MP 347	ND	ND	223	A	NSI	NSI	
MP 157	ND	ND	ND	A	NSI	NSI	
MP 114	ND	ND	32	A	<i>NSI</i>	<i>SI</i>	10 CLONES NSI
MP 110	mai-95	1	ND	B	SI	SI	
MP 291	sep-95	3	551	B	NSI	NSI	
MP 030	sep-94	5	273	B	SI	SI	
Mp 034	oct-94	6	621	B	NSI	NSI	
MP 010	jun-94	7	869	B	NSI	NSI	
MP 039*	mar-94	8	19	B	NSI	NSI	
MP 432**		24	2		ND	SI	5 CLONES NSI
MP 329	fév-95	12	308	B	NSI	NSI	
MP 077	mar-94	13	495	B	NSI	NSI	
MP 105	jan-93	24	532	B	ND	SI	
MP 051	jan-93	25	7	B	SI	SI	
MP 045	sep-92	30	ND	B	NSI	NSI	
MP 016	jan-92	35	448	B	ND	NSI	
MP 036	mar-93	36	299	B	NSI	NSI	
MP 018	déc-91	42	408	B	NSI	NSI	

ISOLAT	Année d'infection	Durée d'infection en mois	Nombre lymphocyte CD4+	SOUS-TYPE par HMA et/ou C2V3 SEQ	PHENOTYPE prédit	PHENOTYPE BIOLOGIQUE	PHENOTYPE PREDIT APRES CLONAGE
MP 279*	jun-93	42	576	B	NSI	NSI	
MP 406**		60	576		NSI	SI	
MP 093	jun-91	47	45	B	NSI	SI	4 CLONES NSI
MP 078	mar-91	49	211	B	NSI	NSI	
MP 029*	nov-90	50	96	B	SI	SI	
MP417**		68	53		SI	ND	
MP 007	mai-90	55	169	B	NSI	NSI	
MP 053	sep-88	78	142	B	NSI	SI	13 CLONES NSI
MP 346	avr-89	81	56	B	NSI	NSI	
MP 015	86	>100	ND	B	NSI	NSI	
MP 013	avr-86	>100	743	B	ND	SI	
MP 293	<87	>100	154	B	ND	NSI	
MP 027	sep-87	>100	15	B	SI	SI	
MP 319	87	>100	119	B	NSI	SI	7 CLONES NSI
MP 122*	87	>100	88	B	NSI	SI	
MP 399**		>100	16		NSI	SI	8 CLONES NSI
MP 032	87	>100	ND	B	NSI	NSI	
MP 021	84	>100	7	B	ND	SI	
MP 245	ND	ND	ND	B	NSI	NSI	
MP 009	ND	ND	39	B	NSI	NSI	
MP 108	ND	ND	366	B	NSI	NSI	
MP 008	ND	ND	210	B	ND	NSI	
MP 056	ND	ND	860	B	ND	NSI	
MP 060	ND	ND	5	B	ND	NSI	
MP 351	ND	ND	549	B	NSI	SI	5 CLONES NSI
MP 017	ND	ND	214	B	NSI	NSI	
MP 024	<90	ND	9	B	ND	SI	

ISOLAT	Année d'infection	Durée d'infection en mois	Nombre lymphocyte CD4+	SOUS-TYPE par HMA et/ou C2V3 SEQ	PHENOTYPE prédit	PHENOTYPE BIOLOGIQUE	PHENOTYPE PREDIT APRES CLONAGE
MP 332	oct-95	4	426	C	NSI	NSI	
MP 098	jun-94	13	389	C	NSI	NSI	
MP 102	jan-94	18	563	C	NSI	NSI	
MP 037	mar-93	20	ND	C	NSI	NSI	
MP 292	mai-94	23	324	C	NSI	NSI	
MP 169	jul-93	26	138	C	NSI	NSI	
MP 129	fév-93	29	225	C	NSI	NSI	
MP 201	nov-92	35	429	C	NSI	NSI	
MP 003	aoû-91	40	345	C	NSI	NSI	
MP 130	mar-92	40	571	C	NSI	NSI	
MP 041	fév-92	41	ND	C	NSI	NSI	
MP 043	oct-92	42	549	C	NSI	NSI	
MP 197	91	48	384	C	NSI	NSI	
MP 320	jan-91	54	235	C	NSI	NSI	
MP 035	jun-90	54	200	C	NSI	NSI	
MP 116	ND	ND	ND	C	NSI	NSI	
MP 348	ND	ND	ND	C	NSI	NSI	
MP 333	ND	ND	ND	C	NSI	NSI	
MP 083	ND	ND	ND	C	NSI	NSI	
							...
MP 323	fév-95	12	334	E	NSI	NSI	
MP 038*	jul-93	19	461	E	NSI	NSI	
MP 096**		22	460		ND	SI	
MP 048*	jun-93	20	191	E	NSI	NSI	
MP406**		38	ND		SI	SI	
MP 044*	jun-93	20	504	E	NSI	NSI	



## VII Références bibliographiques

Andeweg, A., P. Leeflang, A. D. M. Osterhaus, et al. 1993. Both the V1 and V3 regions of the human immunodeficiency virus type 1 surface glycoprotein functionally interact with other envelope regions in syncytium formation. *J. Virol.* 67: 3232-3239.

Charneau, P., A. Borman, C. Quillent, et al. 1994. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of new HIV-1 group. *Virology* 205: 247-253.

Connor, R. I., H. Mohri, Y. Cao, and D. D. Ho. 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with cd4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 67: 1772-1777.

Connor, R. I. and D. D. Ho. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J. Virol.* 68: 4400-4408.

Cornelissen, M., G. Mulder-Kampinga, J. Veenstra, et al. 1995. Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. *J. Virol.* 69: 1810-1818.

De Jong, J., A. De Rond, W. Keulen, M. Tersmette, and J. Goudsmit. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: Analysis single amino acid substitution. *J. Virol.* 66: 6777-6780.

Delahunty, M. D., I. Rhee, E. O. Freed, and J. S. Bonifacino. 1996. Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues. *Virology* 218: 94-102.

DeWolf, F., E. Hogervorst, J. Goudsmit, E., et al.. 1994. Syncytium-inducing (SI) and non-Syncytium-inducing (NSI) capacity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtypes other than B. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1387-1400.

Donaldson, Y. K., J.E. Bell, E. C. Holmes, et al. 1994. In vivo distribution and cytopathology of variants of human immunodeficiency virus type 1 showing restricted sequence variability in the V3 loop. *J. Virol.* 68: 5991-6005.

**Fiore, J. R., A. Björndal, K. Aperia-Peipke, et al.** 1994. The biological phenotype of HIV-1 is usually retained during and after sexual transmission. *Virology* 204: 297-303.

**Fouchier, R. A. M., M. Groenink, N. A. Kootstra et al.** 1994. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol* 66: 3183-3187.

**Freed, E. O., E. L. Delwart, G. L. Bushacher, and A. T. Panganiban.** 1992. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 70.

**Freed, E. O., and M. A. Martin.** 1994. Evidence for a functional interaction between the V1/V2 and C4 domains of human Immunodeficiency Virus Type 1 glycoprotein gp120. *J. Virol.* 68: 2503-2512.

**Groenink, M., R. A. M. Fouchier, S. Broersen et al.** 1993. Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration. *Science* 260: 1513-1516.

**Higgins, D., and P. Sharp.** 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl Biosci* 5: 151-153.

**Holm-Hansen, C., D. Grothues, S. Rustad, et al.** 1995. Characterization of HIV type 1 from Romanian children: lack of correlation between V3 loop amino acid sequence and syncytium formation in MT2 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11: 597-603.

**Karlsson, A., K. Parsmyr, K. Aperia, et al.** 1994a. MT2 cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 isolates as a marker for response to treatment and development of drug resistance. *J. Infect. Dis* 170: 1367-1375.

**Karlsson, A., K. Parsmyr, E Sandström, et al.** 1994b. MT-2 cell tropism as prognostic marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Clin. Microbiol.* 32: 364-370.

**Kasper, P., R. Kaiser, J. Oldenburg, et al.** 1994. Parallel evolution in the V3 region of HIV type 1 after infection of hemophiliacs from a homogeneous source. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1669-1678.

**Keys, B., J. Karis, B. Fadeel, et al.** 1993. V3 sequences of paired HIV-1 isolates from blood and cerebrospinal fluid cluster according to host and show variation related to the clinical stage of disease. *Virology* 196: 475-483.

**Koot, M., A. H. V. Vos, R. P. M. Keet, et al.** 1992. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 6: 49-54.

Koot, M., I. P. M. Keet, Vos AHV, et al. 1993a. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4<sup>+</sup> cell depletion and progression to AIDS. *Ann. Intern. Med* 118: 681-688.

Kusumi, K., B. Conway, S. Cunningham, et al. Human immunodeficiency virus type envelope gene structure and diversity in vivo and after cocultivation in vitro. *J. Virol.* 66: 875-885.

Loussert-Ajaka, I., M.-L. Chaix, B. Korber, et al. 1995. Variability of HIV type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J. Virol.* 69: 5640-5649.

Meyerhans, A., R. Cheynier, J. Albert, et al. 1989. Temporal fluctuations in HIV quasiespecies in vivo are not reflected by sequential HIV Isolations. *Cell.* 58: 901-910.

Miedema, F., L. Meyaard, M. Koot, M. R. Klein, et al. 1994. Changing virus-host interactions in the courses of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 140: 35-72.

O'Brien, W. A., Y. Koyanagi, A. Namazie, et al. 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature (London)* 348: 69-73.

Richman, D. D., and S. A. Bozette. 1994. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J. Infect. Disease* 169: 968-974.

Richman, D. D., 1995. Drug resistance in relation to pathogenesis. *AIDS* 9 (Suppl. A): S49-S54.

Sabri, F., F. Chiodi, and E. M. Fenyö. 1996. Lack of correlation between V3 amino acid sequence and syncytium-inducing capacity of some HIV type 1 isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* : 12: 855-858.

Scarlatti, G., V. Hodara, K. P. Rossi, et al. 1993a. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from mother-to-child correlates with viral phenotype. *Virology* 197: 624-629.

Scarlatti, G., T. Leitner, E. Halapi, et al. 1993. 1993b. Comparaison of variable region 3 sequences of human immunodeficiency virus type 1 from children with the RNA and DNA sequences of the virus populations of their mothers. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1721-1725.

Schellekens, T. T. A., M. Tresmette, M. T. L. Roos, et al. 1992. Biphasic rate of CD4<sup>+</sup> cell count decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype. *AIDS* 6: 665-669.

Schuitemaker, H., M. Koot, N. A. Kootstra, et al. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stage of infection:

progression of disease is associated with shift from monocyto-tropic to cell-tropic virus populations. *J. Virol.* 66: 1354-1360.

**Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer.** 1992. Small amino-acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell line and macrophage tropisme of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9434-9438.

**Stamatatos, L., and C. Cheng-Mayer.** 1993. Evidence that the structural conformation of envelope gp120 affects human immunodeficiency virus type 1 infectivity, host range and syncytium-forming ability. *J. Virol.* 67: 5635-5639.

**Tersmette, M., R. A. Gruters, F. De Wolf, et al.** 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: Studies sequential HIV isolates. *J. Virol.* 63: 2118-2125.

**Tersmette, M., R. E. Y. De Goede, Al BJM, et al.** 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J. Virol.* 62: 2026-202632.

**Wain-Hobson, S.** 1989. HIV genome variability in vivo. *AIDS* 3 (suppl 1): S13-S19.

**Westervelt, P., D. B. Trrowbridge, L. G. Epstein, et al.** 1992. Macrophage tropism determinants of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J. Virol.* 66: 2577-2582.

**Zhong, P. M. Peeters, W. Janssens, et al.** 1995. Correlation between genetic and biological properties of biologically cloned HIV type 1 viruses representing subtypes A, B, and D. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 11: 239248.

## Conclusion et perspectives

---

La caractérisation moléculaire de l'infection à VIH-1 a permis d'identifier les différents sous-types circulant dans différentes zones géographiques et d'évaluer le potentiel de diversité des différentes souches. Nous avons pu disposer d'une cohorte de patients vivant en France mais infectés Outre-mer : pour tous ces patients, la date de contamination est connue et un suivi régulier est effectué. La majorité de ces patients a été infectée à Djibouti, les autres l'ont été au Cambodge, Cameroun, République Centrafricaine, Côte d'Ivoire, Gabon, Guyane, Mayotte et Tchad. La caractérisation des souches isolées de ces patients a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs sous-types A, B, C, D, E et F.

L'analyse phylogénétique fait apparaître une grande hétérogénéité des souches A, B, et C (D et F sont très peu représentées). La divergence de ces souches au sein d'un même sous-type est relativement importante : 16.4% (6.3 - 21.3%) pour le sous-type A, 15.6% (7.4 - 22.0%) pour le sous-type B, 14.8% (6.3 - 21.0%) pour le sous-type C. Par ailleurs, elle fait apparaître deux sous-groupes au sein du groupe C. L'un des sous-groupes est caractérisé par la présence d'un site de N-glycosylation au niveau de la première cystéine de la boucle V3. Ce

site est absent chez les souches de sous-type C déjà décrites (database de Los Alamos). Pour le sous-type A, on observe aussi deux sous-groupes. Cependant, les deux sous-groupes de ces deux sous-types ont des faibles valeurs de "bootstrap", cette subdivision pourrait donc être artéfactuelle et ne reflète que la grande diversité des souches virales. Il serait donc nécessaire d'analyser des régions plus longues de l'enveloppe ainsi que d'autres régions du génome viral afin de pouvoir confirmer l'existence de subdivisions dans les différents sous-types caractérisés actuellement.

Parmi cette population, un pourcentage élevé de patients (38%) sont infectés par le sous-type B. La majorité de l'infection VIH-1 de sous-type B a été contractée à Djibouti, pays d'Afrique de l'est où plusieurs pays occidentaux ont des bases militaires. Cette population d'expatriés a pu être contaminée par des souches de sous-type B, circulant dans un réseau de prostitution. Une autre possibilité serait que ces patients aient été infectés en France durant la période entre le test VIH et leur départ en mission. Cette hypothèse est peu plausible, car cette période est extrêmement courte (0 à 6 mois).

Différents motifs de la boucle V3 sont présents à l'intérieur d'un même sous-type: certaines souches de sous-type B possèdent le motif GLGR retrouvé chez une souche thaïlandaise de sous-type E et chez une souche camerounaise de sous-type F, le motif GPGK retrouvé chez deux souches de sous-type A, l'une d'origine ougandaise et l'autre d'origine centrafricaine, ou le motif GWGR retrouvé chez des souches B brésiliennes. Pour la première fois, une souche de sous-type C présente un motif GPGR caractéristique des souches de sous-type B. Ces différents motifs pourraient jouer un rôle important dans les propriétés biologiques et antigéniques du virus comme plusieurs auteurs l'ont montré (Hwang et coll., 1991; Wertervelt et coll., 1991). De plus, la boucle V3 forme le principal domaine de neutralisation (Rusche et coll., 1988). Dans la perspective de développement d'un vaccin, la question qui se pose actuellement est de savoir si l'efficacité de neutralisation pourrait être

influencée par la variabilité génétique des différents sous-types. La réponse est très controversée. Des études ont montré l'existence d'une corrélation entre le génotype et le sérotype de neutralisation pour les sous-types B et E (Mascola et coll., 1994). En revanche, Kostrikis et collaborateurs (1996) n'ont trouvé aucune corrélation entre les sous-types et les résultats de neutralisation croisée. Ces études ont été effectuées sur un nombre limité de souches et de sous-types. Il est donc nécessaire d'étudier les différents sérotypes de neutralisation du VIH-1 afin que le vaccin développé puisse être efficace dans les pays en voie de développement.

L'épidémiologie de l'infection à VIH pourrait être modifiée en raison de nombreux sous-types qui circulent dans et entre différentes régions du monde. Certains auteurs ont rapporté l'introduction de souches non-B aux Etats Unis et en Europe (Artenstein et coll., 1995, Arnold et coll., 1995). Il a été suggéré qu'en Thaïlande le génotype E pouvait être associé à un risque de transmission hétérosexuelle plus élevé que le génotype B; la prédominance du génotype E pourrait avoir contribué à la diffusion rapide du VIH-1 dans ce pays (Kunanusont et coll., 1995). En effet, la prévalence du sous-type E a augmenté de 2,6% à 43,8% dans la population toxicomane par injection intraveineuse à Bangkok entre 1988 et 1993 (Wasi et coll., 1995; Kalish et coll., 1995). En France, on assiste à une stabilisation du taux d'infection dans la population homosexuelle, et à une augmentation du taux d'infection dans les populations hétérosexuelle et toxicomane par voie intraveineuse (Surveillance du SIDA en France). L'introduction des souches non-B caractéristiques d'Afrique ou d'Asie pourrait dans le futur modifier l'épidémie du VIH en France comme en Thaïlande. Cependant, l'impact des sous-types non-B sur l'épidémie du VIH-1 en France doit être analysé à long terme. Les militaires en mission Outre-mer représentant seulement une faible partie de la population infectée en France, leur influence dans le futur sur la prédominance du sous-type B sera probablement limitée. Récemment, une étude a montré que les sous-types

non-B étaient présents en Belgique depuis le début de l'épidémie dans la population hétérosexuelle, cependant la présence de ces sous-types n'a pas modifié l'épidémie (Fransen et coll., 1996).

D'après la caractérisation moléculaire de ces souches et leur provenance de régions où il a été mis en évidence différents sous-types et virus recombinants ou mosaïques (Gao et coll., 1996), il est probable que certains de nos virus soient recombinants ou mosaïques. Des virus recombinants pourraient avoir un impact sur les propriétés biologiques (pathogénicité, transmission, réplication virale...), antigéniques, et sur la progression de la maladie.

L'analyse des acides aminés en position 11 et 25 de la boucle V3 montre une corrélation entre le phénotype prédit et le phénotype biologique. Cependant des discordances sont observées dans le cas des souches SI. Ces résultats indiquent que d'autres régions de l'enveloppe virale pourraient être impliquées dans le phénotype comme la gp41, la conformation de la gp120, l'interaction entre les régions variables V1/V2 et le domaine C4 de la gp120 (Groenink, et coll., 1993; Andeweg et al, 1993; Stamatatos et Cheng-Mayer, 1993; Freed et Martin, 1994; Delahunty et coll., 1996).

Dans notre étude, l'analyse des phénotypes biologiques en fonction du nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et de la durée d'infection montre que l'apparition des souches SI est corrélée de façon significative à un faible taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et à une longue durée de l'infection dans la majorité des cas et pour l'ensemble des sous-types étudiés. Cette corrélation avait été établie précédemment pour le génotype B, parce que la majorité des études a été réalisée sur des cohortes en Amérique du nord et en Europe. La transition NSI->SI est corrélée à la diminution du nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> chez le patient. Dans notre étude, la transition NSI->SI des souches de sous-type E est observée chez des patients ayant un taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> élevé et cela en un temps très court après la séroconversion. La transition NSI->SI d'une

souche B a entraîné la chute des lymphocytes CD4<sup>+</sup> chez un patient, alors que pour un autre patient, le taux des lymphocytes CD4<sup>+</sup> est resté constant. L'apparition des souches SI pourrait être responsable en partie de la diminution des lymphocytes CD4<sup>+</sup>. Ces observations suggèrent que ces phénomènes dépendent des propriétés virales et de l'état immunologique du patient.

Les résultats sur la corrélation entre le phénotype biologique et la progression de la maladie d'une part, et entre les propriétés génétiques et propriétés biologiques des différents sous-types d'autre part sont encore préliminaires, et aucune différence significative n'a été mise en évidence. Cependant, le nombre des patients reste relativement faible et le suivi pour chaque sous-type n'a été effectué que sur une courte durée.

Ces patients infectés par des virus de sous-type non-B, dont la date de contamination est connue et ayant un suivi médical régulier, constituent un bon modèle pour étudier l'impact des différents sous-types sur l'histoire naturelle de l'infection à VIH-1 et le pronostic de la maladie.

# Bibliographie

---

Abimiku, A. G., T. L. Stern, A. Awandor, P. D. Markham, C. Calef, et al. 1994. Subgroup G HIV Type 1 Isolates from Nigeria. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 11: 1581-1583.

Ahmad, N. and S. Vankatesan. 1988. Nef Protein of HIV-1 is a transcriptional Repressor of HIV-1 LTR. *Science* 241: 1481.

Ait-khaled, M., J. E. McLaughlin, M. A. Johnson, and V.C. Emery. 1995. Distinct HIV-1 long terminal repeat quasispecies present in nervous tissues compared to that in lung, blood and lymphoid tissues of an AIDS patient. *AIDS* 9: 675-683.

Albert, J., B. Abrahamsson, K. Nagy, et al. 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralisation by autologous sera. *AIDS* 4: 107-112.

Aldovini, A., R. A. Young. 1990. Mutations of RNA and protein sequences in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* 64: 1920.

Alizon, M., F. Barré-Sinoussi, P. Sonigo, et al. 1984. Molecular cloning of lymphadenopathy associated virus (LAV). *Nature* 312: 757.

Alizon, M., S. Wain-Hobson, L. Montagnier, and S. Sonigo. 1986. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from two African patients. *Cell* 46: 63-74.

**Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, et al.** 1996. CC CKR5: A RANTE, MIPa, MIPb Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-1958

**Andreasson, P. A., F. Dias, A. Nauc ler, S. Andersson, and G. Biberfeld.** 1993. A prospective study of vertical transmission of HIV-2 in Bissau, Guinea-Bissau. *AIDS* 7: 989-993.

**Arendrup, M., C. Nielsen, J. R. S. Hansen, et al.** 1992. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J. Acq. Imm. Def. Syndr.* 5: 303-307.

**Arnold, C., K. L. Barlow, J. V. Parry, and J. P. Clewley.** 1995. At least five HIV-1 sequence subtypes (A, B, C, D, A/E) Occur in England. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11: 427-429.

**Arteinstein, A., C. Thomas, J. R. Mascola, J. K. Car, et al.** 1995. Dual Infection with Human Immunodeficiency Virus Type 1 of Distinct Envelope Subtypes in Humans. *J. Infec. Dis.* 171: 805-810.

**Arthos, J., K. C. Deen, M. A. Chaikin, et al.** 1989. Identification of the residues in Human CD4 critical for binding of HIV. *Cell* 57: 469.

**Baber, A. M., A. Hizi, J. V. Maizel, and S. H. Hugues.** 1990. HIV-1 reverse transcriptase: structure predictions for the polymerase domain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6: 1061.

**Balfe, P., P. Simmonds, C. A. Ludlam, J. O. Bishop, and A. J. Leigh Brown.** 1990. Concurrent evolution of human immunodeficiency virus type 1 in patients infected from the same source: rate of sequence change and low frequency of inactivating mutations. *J. Virol.* : 6221-6233

**Ball, J. K., E.C. Holmes, H. Whitwell, and U. Desselberger.** 1994. Genomic variation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): Molecular analyses of HIV-1 in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J. Gen. Virol.* 75: 867-879

**Baltimore D.** 1970. Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature* 226: 1209-1211.

**Barat, C., O. Schatz, S. Le Grise, and J. L. Darlix.** 1993. Analysis of the interaction of HIV-1 replication primer tRNA<sup>Lys</sup>, 3 with nucleocapsid protein and reverse transcriptase. *Mol. Biol.* 231: 185.

**Barin, F., S. Mboup, F. Denis, et al.** 1985. Serological evidence of a virus related to simian T-lymphotropic retransvirus III in residents of West Africa. *Lancet* ii: 1387-1389.

**Barré-Sinoussi, F., J. C. Cherman, F. Rey, et al.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.

**Barreto, J., J. Liljestrand, C. Palha de Souza, et al.** 1993. HIV-1 and HIV-2 antibodies in pregnant women in the city of Maputo, Mozambique: a comparative study between 1982/1983 and 1990. *Scand. J. Infect. Dis.* 25: 685-688.

**Baur, A. S., E. T. Swai, P. Dazin, et al.** 1994. HIV-1 nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular. *Cell* 1: 373-384.

**Benenek, K. J. D. Abbotts, J. D. Roberts, S. H. Wilson, and T. A. Kunkel.** 1989. Specificity and mechanism of error-prone replication by Human Immunodeficiency Virus-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* 264: 16948-16956.

**Bebenek, K. and T.A. Kunkul.** 1993. The fidelity of retroviral reverse transcriptase. In *Reverse transcriptase*. Skalka A.M and S.P. Goff (eds), Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 85-102.

**Benn, S., R. Rultedge, T. Folks, J. Gold, et al.** 1985. Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science* 230: 949-951.

**Bergeron, L., N. Sullivan, and J. Sodroski.** 1992. Target cell-specific determinants of membrane fusion within the immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable and gp41 amino terminus. *J. Virol.* 66: 2389-

**Bilan OMS, 1994.**

**Bilan OMS, janvier 1995.**

**Blanc, D., C. Patience, T. F. Schultz, R. Weiss, and B. Spire.** 1993. Transcomplementation of vif- HIV-1 mutants in CEM cells suggests that vif affects late steps of the viral life cycle. *Virology* 193: 186.

**Bobkov, A., R. Cheingsong-Popov, M. Salminen, et al.** 1996. Complex mosaic structure of the partial envelope sequence from a Gambian HIV Type 1 Isolate. *AIDS Rec. Hum. Retroviruses* 12: 169-171.

**Bobokov, A., R. Cheingsong-Popov, M. Garaev, and al.** 1994. Identification of an env G subtype strains in the Russian Federation and Belarus. *AIDS* 8: 1649-1655.

**Boeri, E., A. Giri F. lillo, G. Ferrari, et al.** 1992. In vivo genetic variability of the human immunodeficiency virus type 2 V3 region. *J. Virol.* 66: 4556-4550.

**Bollinger, R. C., S. P. Tripathy, and T. C. Quinn.** 1995. The human immunodeficiency virus epidemic in India. Current magnitude and future projections. *Medecine* 74: 97-106

**Borman, A. M., C. Quillent, P. Charneau, K. M. Kean, and F. Clavel.** 1995. A highly defective HIV-1 group O provirus: Evidence for role of local sequence determinants in G→A hypermutation during negative-strand viral DNA synthesis. *Virology* 208: 601-609.

**Borroto-Esoda, K., and L. R. Boone.** 1991. Equine infectious anemia virus and human immunodeficiency virus DNA synthesis in vitro: characterization of the endogenous reverse transcriptase reaction. *J. Virol.* 65: 1952-1959.

**Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and M. B. A. Oldstone.** 1994. Virus-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 68: 6103-6110.

**Borzy, M. S., R. S. Connell, and A. A. Kiessling.** 1988. Detection of human immunodeficiency virus in cell-free seminal fluid. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 1: 419-424.

**Bottiger, B., K. Ljunggren, A. Karlsson, et al.** 1988. Neutralizing antibodies in relation to antibody dependent cellular cytotoxicity inducing antibodies against human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Exp. Immunol.* 73: 339-342.

**Boufassa, F., C. Bachmeyer, N. Carré, et al.** 1995. Influence of neurologic manifestations of primary human immunodeficiency virus infection on disease progression. *J. Infect. Dis.* 171: 1191-1195.

**Bour, S., F. Boulerice, and M. A. Wainberg.** 1991. Inhibition of gp160 and CD4 maturation in U937 cells after both defective and productive infections by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 65: 6387-6396.

**Bour, S., U. Schubert, and K. Strebel.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J. Virol.* 69: 1510-1520.

**Boyd, R. L., C. L. Tucek, D. I. Godfrey, and al.** 1993. The thymic microenvironment. *Immunol. Today* 14: 445.

**Boyer, V., C. Desgranges, M. A. Trabaud, et al.** Complement mediates human immunodeficiency virus type 1 infection of human T cell line in CD4- and antibody-independent fashion. *J. Exp. Med.* 173: 1151-1158.

**Brown, T., W. Sittirai, S. Thisyakon et al.** 1994. The recent epidemiology of HIV and AIDS in Thailand. *AIDS* 8 (Suppl2): S131-S141

**Bruce, C., C. Clegg, A. Featherstone, et al.** 1994. Presence of multiple genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 proviruses in Uganda. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1543-1550.

Burkrinsky, M. I., N. Sharova, M. P. Dempsey, et al. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6580.

Campodonico, M., W. Janssens, L. Heyndrickx, et al. 1996. HIV type 1 Subtype in Argentina and Genetic Heterogeneity of the V3 Region. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12: 79-81.

Cann, A. J., M.J. Churcher, M. Boyd, and al. 1992. The region of the Envelope Gene of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Responsible for determination of cell Tropism. *J. Virol.* 66: 305.

Cann, A. J., and J. Karn. 1989. Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. *AIDS* 3 (suppl1): S19-S34.

Cao, Y., L. Qin, L. Zhang, J. Safrin, and D. D. Ho. 1995. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 332: 201-208.

Carrilo, A., and L. Ratner. 1996. Cooperative Effects of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Variable Loops V1 and V3 in Mediating Infectivity for T Cells. *J. Virol.* 70: 1310-1316.

Chakrabarti, L., M. Guyader, M. Alizon, et al. 1987. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* 328: 543-547.

Charneau, P., A. Borman, C. Quillent, et al. 1994. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of new HIV-1 group. *Virology* 205: 247-253.

Chen, S., C. N. Lee, W. R. Lee, K. McIntosh, and T. H. Lee. 1993. Mutational analysis of the leucine zipper -like motif of the human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 67: 3615.

Chen, Z., P. Telfer, A. Gettie, P. Reed, et al. 1996. Genetic characterization of New West African Simian Immunodeficiency Virus SIVsm: Geographic Clustering of Household-Derived SIV Strains with the Human Immunodeficiency Virus type 2 Subtypes and Genetically Diverse Viruses from a single Feral Sooty Mangabey Troop. *J. Virol.* 70: 3617-3627.

Cheng Mayer, C., D. Seto, M. Tateno, and J. A. Levy. 1988. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* 240: 80-82

Cheng-Mayer, C., P. Iannello, K. Shaw, P.A. Luciw, and J. A. Levy. 1989. Differential effects of *nef* on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science*, 246: 1629-1632

**Cheng-Mayer, C., T. Shioda, and J. A. Levy.** 1991. Host range, replicative, and cytopathic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by very few amino acid changes in tat and gp120. *J. virol.* 65: 6931-6941.

**Cheng-Mayer C. and J.A. Levy.** 1990. Human immunodeficiency virus infection of the CNS: characterization of "neurotropic" strains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 160: 145-156.

**Chowers, M. Y., C. A. Spina, A. J. Chuang, K. F. Kilan, et al.** 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J. Virol.* 68: 2906-2914.

**Clark, S. J., M. S. Sag, W. D. Decker, S. Campbell-Hill, et al.** 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324: 954- 960.

**Clavel, F, D Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, F. Rey, et al.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346

**Clayton, L. K., R. E. Hussey, R. Streinbrich, et al.** 1988. Substitution of murine of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV-gp120 binding. *Nature (London)* 335: 363-366.

**Clayton, L. K., M. Sieth, D. A. Pious, and E. L. Reinhertz.** 1989. Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 binding. *Nature* 339: 548-551

**Coffin, J.** 1984. Endogenous viruses . In R. Weiss et al. eds. *RNA Tumor viruses*, 2nd ed., Cold Spring Harbor laboratory press. p. 1109-1203.

**Coffin, J.** 1992. Structure and classification of retroviruses. In J. A. Levy, ed. 1. *The retroviridae*, vol. 1. New York: Plenum press. p. 19-43.

**Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, et al.** 1986. What to call the AIDS virus. *Nature* 321: 10.

**Coffin, J. M.** 1990. Retroviridae and their replication. In *virology*, 2nd ed. Fields B. N., Kinpe D. M., Chanock R. M., Hirsch M. S., Melnick J. L., Monath T. P. and Roizman B. (eds.), New York. Raven Press, p. 1437-1500

**Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* 344: 532-534.

**Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, Y. Jalinoos, et al.** 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 3: 11-18.

**Colebunders, R., H. Francis, M.D. Mavunza, et al.** 1990. HIV-1 infection in HIV- & enzyme-linked immunoassay seronegative patients in Kinshasa, Zaire. *Int. J. STD. AIDS* 1: 330-334.

**Connor, R. I., B. K. Chen, S. Choe, and N. R. Landau.** 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206: 935-944.

**Connor, R. I. and D. D. Ho.** 1994. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J. Virol.* 68: 4400-4408.

**Cordonnier, A., L. Montagnier, and M. Ermeman.** 1989. Single Amino-Acid Changes in HIV Envelope Affect Viral Tropism and receptor Binding. *Nature* 340: 571.

**Cornelissen, M., G. Mulder-Kampinga, J. Veenstra, et al.** 1995. Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. *J. Virol.* 69: 1810-1818.

**Cortes, E., R. Detels, D. Aboulaflia, X. L. Li, T. Moudgil, et al.** 1989. HIV-1, HIV-2, and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 320: 953-958.

**Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, et al.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-767.

**Daniel, M. D., F. Kirchhoff, S. C. Czajak, P. K. Sehgal, and R. C. Desrosiers.** 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258: 1938-1941.

**Daniel, M. D., N. L. Letvin, N. W. King, et al.** 1985. Isolation of a T-cell tropic HTLV III-like retrovirus from macaques. *Science* 228: 1201-1204.

**Dayton, E. T., D. A. M. Konings, S. Y. Lim, et al.** 1993. The RRE of human immunodeficiency virus type 1 contributes to cell-type specific viral tropism. *J. Virol.* 67: 2871-2878.

**Dayton, E. T., D. M. Powell, and A. I. Dayton.** 1989. Functional analysis of CAR, the target sequence for the Rev protein of HIV-1. *Science* 246: 1625-1629.

**De Jong, J., A. De Rond, W. Keulen, M. Tersmette, and J. Goudsmit.** 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: Analysis single amino acid substitution. *J. Virol.* 66: 6777-6780.

De Ronde, A., B. Klaver, W. Keulen, L. Smit, and J. Goudsmit. 1992. Natural *nef* accelerate virus replication in primary human lymphocytes. *Virology* 188: 391-395

Delaporte, E., W. Janssens, M. Peeters, et al. 1996. Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Gabon, 1986-1994. *AIDS* 10: 903-910.

De leys, R., B. Vander borcht, M. Van den Haesevelde, et al. 1990. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of West-Central African origin. *J. Virol.* 64: 1207-1216.

De Noray, G., F. Biron, B. Verrier, et al. 1993. Manifestations cliniques et biologiques de la primo-infection par le virus de l'immunodéficience humaine: revue de la littérature. *Méd. Mal. Infect.* 23: 1-10.

Dedera, D. A., R. Gu, and L. Ratner. 1992. Role of asparagine-linked glycosylation in human immunodeficiency virus type 1 transmembrane envelope function. *Virology* 187: 377.

DeWolf, F., E. Hogervorst, J. Goudsmit, E. M. Fenyö, et al.. 1994. Syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes others than B: Phenotypic and genotypic characteristics. *AIDS RES. Hum. Retrovirus* 10: 1387-1400.

Diaz, R.S., E. C. Sabono, A. Mayer, et al. 1995. Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. *J. Virol.* 69: 3273-3281.

Dietrich, U., M. Grez, and H. Von Briesen. 1993. HIV-1 strains from India are highly divergent from prototypic African and US/European strains, but are linked to a South African isolate. *AIDS* 7: 23-27.

Dimitrescu, O., M. L. Kalish, S. C. Kilks, C.I. Bandea, and J.A. Levy. 1994. Characterisation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 isolates from children in Romania: identification of new envelope subtype. *J. Inf.Dis.* 169: 281-288.

Donaldson, Y. K., J.E. Bell, E. C. Holmes, et al. 1994a. In vivo distribution and cytopathology of variants of human immunodeficiency virus type 1 showing restricted sequence variability in the V3 loop. *J. Virol.* 68: 5991-6005.

Donnelly, C., W. Leisenring, P. Kanki, et al. 1993. Comparison of transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in a cohort of prostitutes in Senegal. *Bull. Math. Biol.* 55: 731-743.

Dowbenko, D., G. Nakamura, C. Fennie, et al. 1988. Epitope mapping of the human immunodeficiency type 1 gp120 with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 62: 4703-4711.

- Drake, J. W.** 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7160-7164.
- Drake, J. W.** 1991. Rate of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4171-4175.
- Emau, P., H. M. McClure, M. Isahakia, J. G. Else, and P. N. Fultz.** 1991. Isolation from African Syke's monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 65: 2135-2140.
- Embreston J., M. Zupancic, J. L. Ribas, et al.** 1993. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362: 359-362.
- Emerman, M., R. Vazeux, and K. Peden.** 1989. The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localisation. *Cell* 57: 1155-1165
- Enbenbichler, C., P. Westervelt, A. Carrillo, et al.** 1993. Structure-function Relationships of the HIV-1 Enveloppe V3 Loop Tropism Determinant Evidence for two Distinct Conformations. *AIDS* 7: 639.
- Ensoli, B., G. Barillari, Z. Salahuddin, et al.** 1990. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature (London)* 345: 84-86.
- Felberg, B. K., M. Hadzopoulou-Cladaras, C. Cladaras et al.** 1989. Rev Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Affect the Stability and Transport of the Viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1495
- Fenyö, E.M., and A. J. Asjo.** 1989: Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* 3: S5-S12.
- Fischer, A., B. Ensoli, L. Ivanoff, et al.** 1987. The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* 237: 888-893.
- Fox, R. I., I. Saito, E. K. Chan, S. Josephs et al.** 1989. Viral genomes in lymphomas patients with Sjogren's syndrome. *J. Autoimmun.* 2: 449-455.
- Fransen, K., A. Buve, J. Nkengasong, M. Laga, and G. van der Groen.** 1996. Longstanding presence in Belgians of multiple non-B HIV-1 subtypes. *Lancet* 347: 1403.
- Freed, E. O., E. L. Delwart, G. L. Bushacher, and A. T. Panganiban.** 1992. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 70.

Freed, E. O., and M. A. Martin. 1994. Evidence for a functional interaction between the V1/V2 and C4 domains of human Immunodeficiency Virus Type 1 glycoprotein gp120. *J. Virol.* 68: 2503-2512.

Fujita, K., J. Silver, and K. Peiden. 1992a. Changes in Both gp120 and gp41 Can Account for increased Growth Potential and Expanded Host Range of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 66: 4445.

Fujita, T., G. P. Nolan, S. Ghosh, and D. Baltimore. 1992b. Independent Modes of Transcriptional Activation by the p50 and p65 Subunits of NF- $\kappa$ B. *Genes and Dev.* 6: 775.

Fultz, P. N., H. M. McClure, D. C. Anderson, et al. 1986. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 5286-5290

Gabuzda, D. H., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, et al. 1992. Role of Vif in Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in CD4<sup>+</sup>T Lymphocytes. *J. Virol.* 66: 6489.

Gaine, H., M. Von Sydow, J. V. Parry, et al. 1988. Detection of immunoglobulin Mantibody in primary human immunodeficiency virus infection. *AIDS* 2: 11-15

Gallaher, W. R. 1987. Detection of fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 50: 327-328.

Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.

Gao, F., L. Yue, A. T. White, P. G. Pappas, J. Barchue, A. P. Hanson, et al. 1992. Human infection by genetically diverse SIVsm-related HIV-2 in West Africa. *Nature (London)* 358: 495-499.

Gao, F., L. Yue, D. L. Robertson, S. C. Hill, H. Hui, et al. 1994a. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.* 68: 7433-7447.

Gao, F., L. Yue, S. Graig, L. Thornton, et al. 1994b. Genetic variation of HIV type 1 in four World Health Organisation-sponsored vaccine evaluation sites: generation of functional envelope (glycoprotein 160) clones representative of sequence subtypes A, B, C and E. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1359-1368.

Garcia, J. V., J. Alfano, and D. Miller. 1993. The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J. Virol.* 67: 1511-1516

Gayle, H., E. Gnaore, G. Adjorlolo, et al. 1992. HIV-1 and HIV-2 infection in children in Abidjan, Côte d'Ivoire. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5: 513-517.

Gelderblom, H. R. 1991. Assembly and morphology of Hiv: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5: 617-638.

Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli, and M.A. Koch. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins *Virology* 156: 171-176.

Girard, M. 1993. Diversity in Central Africa. The 4th Japan-France Meeting on AIDS and Retrovirus Research. Tokyo, (Abstract, p.17).  
Goff, 1992; 17

Gonclaves, J., P. Jallepalli, and D. H. Gabuzda. 1994. Subcellular localisation of the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 68: 704.

Göttlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1989. Role of capsid precursor processing and myristylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1.

Goudmit, J., N. K. Back, and P. L. Nara. 1991. Genomic diversity and antigenic variation of HIV-1: Links between pathogenesis, epidemiology and vaccine development. *FASEB J.* 5: 2427-2436.

Graziosi, et al. 1994. Lack of evidence for the dichotomy of Th1 and Th2 predominance in HIV-infected patients. *Science* 265:248.

Graziosi, C., G. Pantaleo, D. P. Kotler, and A. S. Fauci. 1992. Dissociation between HIV expression in peripheral blood versus lymphoid organs of the same patients. *Clin. Res.* 40: 333A

Greene, W. C. 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324: 308-317.

Greenough, T. C., M. Somasundaran, D. B. Brettler, et al. Normal Immune Function and Inability to Isolate Virus in Culture in an Individual with Long-Term Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 395-403

Grez, M., U. Dietrich, P. Balfe, H. Von Briesen, and al. 1994 Genetic analysis of human Immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses. *J. Virol.* 68: 2161-2168.

Groenink, M., A. C. Andeweg, R. A. M. Fouchier, et al. 1992. Phenotype-associated env gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: Evidence for in vivo recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J. Virol.* 66: 6175-6180.

Gürtler, L. G., P. H. Hauser, J. Eberle, et al. 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MPV-5180) from Cameroon. *J. Virol.* 68: 1581-1585.

Guy, B., M. P. Kieny, Y. Riviere, et al. 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* 330: 266-269.

Guy, B., M., Y. Riviere, K. Dott, A. Regnault, and M. P. Kieny. 1990, Mutational analysis of the HIV nef protein. *Virology* 176: 413.

Hammes, S. R., E. P. Dixon, M. H. Malim, B. R. Cullen, and W. C. Greene .. 1989. Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:: 9549-9553.

Hattori N., F. Michaels, K. Fagnoli, et al. 1990. The human immunodeficiency virus type 2 vpr gene is essential for productive infection of human macrophages. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8080-8084.

Hattori, T., A. Koito, K. Takatsuki, H. Kido, and N. Katunuma. 1989. Involvement of tryptase-related cellular protease(s) in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FEBS Letters* 248: 48.

Haverkos, H.W., and T. C. Quinn. 1995a. The third wave: HIV infection among heterosexuals in the United States and Europe. *Inf. J. STD AIDS* 6: 227-232.

Haverkos, H.W., and T. C. Quinn. 1995b. HIV infection in the Caribbean. *Int. J. STD AIDS* 6: 227-232.

Healey, D. S., W. J. Maskill, and I. D. Gust. 1989. Detection of anti-HIV IgM by particle agglutination following acute HIV infection. *AIDS* 3: 301-304.

Henin, Y., L. Mandelbrot, R. Henrion, et al. 1993. Virus excretion in the cervicovaginal secretions of pregnant and nonpregnant HIV-infected women. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 6: 72-75.

Hirsch, V.M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, et al. 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339: 389-391

Hirsch, V. M., G. Dapolito, P. R. Johnson , et al. 1995. Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication. *J. Virol.* 69: 955-967.

Hirsch, V.M., G. A. Dapolito, S. Goldstein, et al. 1993. A distinct african lentivirus from Sykes' monkeys. *J. Virol.* 67: 1517-1528.

- Hirsch, V.M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, et al. 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339: 389-391.
- Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, et al. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373: 123-126.
- Homsy, J., M. Meyer, M. Tateno, S. Clarkson, and J. A. Levy. 1989. The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells. *Science* 244: 1357.
- Homsy, J., M. Meyer, M. Tateno, and J. A. Levy. 1988. Antibody -dependent enhancement of HIV infection. *Lancet* i: 1285.
- Hu, S. I., B. M. Travis, J. Carrigues, et al. 1990. Processing, assembly, and immunogenicity of human immunodeficiency virus core antigens expressed by recombinant vaccinia virus. *Virology* 179: 321-329.
- Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson. 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345: 356-358.
- Hwang, S. S., T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and R. C. Cullen. 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 253: 71-74.
- Itescu, S., P. F. Simonelli, R. J. Winchester, and H. S. Ginsberg. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 strains in the lungs of infected individuals evolve independently from those in peripheral blood and are highly conserved in the C-terminal region of the envelope V3 loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 11378-11382.
- Jamieson, B.D., G. M. Aldrovandi, V. Planelles, et al. 1994. Requirement of human immunodeficiency virus type 1 *nef* for in vivo replication and pathogenicity. *J. Virol.* 68: 3478-3485.
- Janssens W, L. Heyndrickx, K. Fransen, et al. 1994a. Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 1577-1579
- Janssens, W., J. N.. Nkengasong, L. Heyndrickx, et al. 1994b. Further evidence of the presence of genetically very aberrant HIV-1 strains in Cameroon and Gabon. *AIDS* 8: 1012-1013
- Jeang, K.-T., R. Chun, N. H. Lin, A. Gatognol, C. G. Glabe, and H. Fan. 1993. In vitro and in vivo binding of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and Sp1 transcription factor. *J. Virol.* 67: 6224-6233.
- Kaleebu, P. A. Bobkov, R. Cheigsong-Popov, et al. 1995. Identification of HIV-1 Subtype G from Uganda. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11: 657-659.

Kaldor, J. M., W. Sittitrai, T. J. John and T. Kitamura. 1994. The emerging epidemic of HIV infection and AIDS in Asia and the Pacific. *AIDS* 8 (Suppl 2): S165-172.

Kalish, M. L., A. Baldwin, S. Raktham, C. Wasi, et al. 1995. The evolving molecular epidemiology of HIV-1 envelope subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand: implications for HIV vaccine trials. *AIDS* 9: 851-857.

Kaminchick, J., N. Brshan, D. Pinchasi, B. Amit et al. 1990. Expression and biochemical characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef gene product. *J. Virol.* 64: 3447-3454.

Kanki, P. J., K. U. Travers, S. Mboup et al. 1994. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 343: 943-946.

Kanki, P. J., and K. M. De Cock. 1994. Epidemiology and natural history of HIV-2.

Kanki, P. 1988. Perinatal transmission of HIV-2 IV international conference on AIDS. Stockholm, June (abstract 6601).

Kaslow, R. A., R. Duquesnoy, M. Van Raden, et al. 1990. AI, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of t-helper lymphocytes HIV-1 infection. *Lancet* 335: 927.

Kasper, P., R. Kaiser, J. Oldenburg, et al. 1994. Parallel evolution in the V3 region of HIV type 1 after infection of hemophiliacs from a homogeneous source. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1669-1678.

Kim, S. Y., K. Ikeuchi, R. Byrn, J. Gropman, and D. Baltimore. 1989. Lack of a negative influence on viral growth by the *nef* gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9544-9548.

Kim, S. Y., K. Ikeuchi, R. Byrn, J. Gropman, and D. Baltimore. 1989. Lack of negative influence on viral growth by *nef* gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9544-9548.

Klatzman, D., F. Barre-Sinoussi, M. T. Nugeyre, et al 1984. Selective tropism of lymphadenopathy-associated virus (LAV) for helper-inducer lymphocytes. *Science* 225: 59-63.

Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin and J. M. Orenstein. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* 64: 621-629.

**Kodama, T., K. Mori, T. Kawahara, D. J. and R. Derosiers.** 1993. Analysis of simian immunodeficiency virus sequence variation in tissues of rhesus macaques with simian AIDS. *J. Virol.* 67: 6522-6534.

**Koenig, S., H. E. Gendelman, J. M. Orenstein, et al.** 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233: 1089-1093.

**Kondo, E., F. Mammano, E. A. Cohen, and H. G. Göttlinger.** 1995. The p6<sub>gag</sub> domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J. Virol.* 69: 2759-2764.

**Korber, B. T. M., K. J. Kunstman, B. K. Patterson, et al.** 1994a. Genetic differences between blood- and brain-derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1 infected patients: Evidence of conserved elements in the V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences. *J. Virol.* 68: 7467-7481.

**Korber, B. T. M., K. Macinnes, R. F. Smith and G. Myers.** 1994b. Mutational trends in V3 loop protein sequences observed in different genetic lineages of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 68: 6730-6744.

**Kostrikis, L. G., E. Bagdades, Y. Cao, L. Zhang, D. Dimitriou, and D. D. Ho.** 1995. Genetic analysis of human immunodeficiency type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J. Virol.* 69: 6122-6130.

**Kostrikis, L. G., Y. Cao, H. Ngai, J. Moore, and D. Ho.** 1996. Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F and I: lack of correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum dependant infectivity enhancement. *J Virol* 70: 445-458

**Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, et al.** 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* 68: 4650-4655.

**Kowalski, M. L., J. Potz, L. Basiripour, et al.** 1987. Functional region of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237: 1351.

**Kuiken, C. L. and B. T. M. Korber.** 1994. Epidemiological significance of intra- and inter-person variation of HIV-1. *AIDS* 8 (Suppl): S73-S83.

**Kumar, P., X. Hui, J. C. Kappes, et al.** 1990. Molecular characterization of an attenuated human immunodeficiency virus type 2 isolate. *J. Virol.* 64: 890-901

**Kunanusont C, Foy HM, Kreiss JK et al . 1995. HIV-1 subtypes and male to female transmission in Thailand. Lancet 345: 1078-1083**

**Kusumi, K., B. Conway, S. Cunningham, A. Evans, et al. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gene structure and diversity in vivo and after cocultivation in vitro. J. Virol. 66:875-885.**

**Lamhamedi-Cherradi, S., B. Culmann-Penciolelli, B. Guy, et al. 1995. Different patterns of HIV-1 specific cytotoxic T lymphocyte activity after primary infection. AIDS 9: 421-426.**

**Lasky, L. A., G. Nakamura, D. H. Smith, et al. 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 critical for interaction with CD4 receptor. Cell 50: 975.**

**Lasky, M., J. L. Perret, M. Peeters, et al. Genetic of HIV1 strains from individuals infected after overseas employment reveals the presence of multiple non-B subtype and divergent HIV-1 subtype B strains in France. sous presse.**

**Lee, T. H., J. E. Coligan, J. S. Allan, M. F. McLane, J. E. Groopman, and M. Essex. 1986. A new HTLVIII/LAV protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses. Science 231: 1546.**

**Letvin, N. L., M. D. Daniel, P. K. Sehgal, et al. 1985. Induction of AIDS-like disease in macaques with T-cell tropic retrovirus STLV-III. Science 230: 71-73.**

**Lever, A., W. Haseltine, and J. Sodroski. 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. J. Virol. 63: 4085.**

**Levy, D. N., L. S. Fernandes, W. V. Williams, and D. B. Weiner. 1993. Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus type 1 vpr. Cell 72: 541-550.**

**Levy, D. N., Y. Refaely, R. R. MacGregor, and D. B. Weiner. 1994. Serum Vpr regulates productive infection and latency of human immunodeficiency virus type 1. Proc. Natl. Acad . Sci. USA 91: 10873-10877.**

**Levy, J. A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. Microbiol. Rev. 57: 183-289.**

**Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, et al. 1984. Isolation of lymphocytopathic retrovirus from San Francisco patient with AIDS. Science 232: 998.**

**Levy, D. N., Y. Refaeli, and D. B. Weiner. 1995. Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus replication and reactivates virus from latency. J. Virol. 69: 1243-1252.**

Li, W. H., M Tanimura, and P. M. Sharp. 1988. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 5: 313-330.

Li, C. J., D. J. Friedman, C. Wang, V. Metelev, and A. B. Pardee. 1995. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268: 429-431.

Lifson, J. D., D. M. Rausch, V. S. Kalyanaraman, et al. 1991. Synthetic peptides allow discrimination of structural features of CD4 (81-92) important for HIV-1 infection versus HIV-1 induced syncytia formation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7: 521.

Lori, F., L. Hall, P. Lusso, M. Popovic, P. Markhan, et al. 1992. Effect of reciprocal complementation of two defective human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) molecular clones on HIV-1 cell tropism and virulence. *J. Virol.* 66: 5553-5560.

Loussert-Ajaka, I., M.-L. Chaix, B. Korber, et al. 1995. Variability of HIV type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J. Virol.* 69: 5640-5649.

Loussert-Ajaka, I., D. Descamps, F. Simon, F. Brun-Vezinet, and S. Saragosti. 1995. Genetic diversity and HIV detection by PCR. *Lancet* 346: 912-913.

Louwagie J. , F. E. McCutchan, M. Peeters, et al. 1993. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence of multiple genotypes. *AIDS* 7: 769-780.

Louwagie J. , W. Jassens, J. Mascola, et al. 1995. Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. *J. Virol.* 69: 263-271.

Lowenstine, L. J., N. C. Pedersen, J. Higgins, et al. 1986. Seroepidemiologic survey of captive old-world primates for antibodies to human and simian retroviruses, and isolation of a lentivirus from sooty mangabeys (*Cercocebus atys*). *Int. J. Cancer* 38: 563-574.

Luciw, P. A., S. J. Potter, K. Steimer, D. Dina, and J. A. Levy. 1984. Molecular cloning of AIDS associated virus. *Nature* 312: 20.

Luo, G., and J. Taylor. 1990. Template switching by reverse transcriptase during DNA synthesis. *J. Virol.* 64: 4321.

Luo, L., Y. Li, and C. Y. Kang. 1990. Expression of gag precursor protein and secretion of virus-like gag particules of HIV-2 from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Virology* 179: 874-880.

Luria et al. 1991. Expression of the type 1 human immunodeficiency virus *nef* protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukine 2 mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5326-5330.

Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, et al. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. Cell 47: 333.

Malim, M.H., L. S. Tiley, D. F. McCarn, et al. 1990. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. Cell 60: 675-683.

Mariani, R., and J. Skowronski. 1993. CD4 down-regulation by *nef* alleles isolated from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5549-5553.

Martin, M. A., 1993. The molecular and biological properties of human immunodeficiency virus. The molecular basis of blood diseases. The W. B. Saunders Co., Philadelphia.

Markovitz, D.M. 1993. Infection with HIV2. Ann. Int. Med. 118: 211-218.

Marlink, R., P. Kanki, I. Thior, et al. 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. Science 265: 1587-1590.

Marlink, R. 1996. Lessons from the second AIDS virus, HIV-2. AIDS 10: 689-699.

Mastuura, Y., M. Maekawa, S. Hattori, N. Ikegami, A. Hayashi, et al. 1991. Purification and characterization of human immunodeficiency virus type 1 *nef* gene product expressed by a recombinant baculovirus. Virology 184: 580-586.

McCutchan, F. E., P. A. Hegerich, and T. P. Brennan. 1992a. Genetic variants of HIV-1 in Thailand. AIDS Res. HUM. Retroviruses 8:1887-1895.

McDougal, J. S., M. S. Kennedy, J. M. Slish, et al. 1986. Binding of HTLVIII/LAV to T4+ T cells by a complex of 110kD viral protein and T4 molecules. Science 231: 382.

McKeating, J. A. and R. L. Willey. 1989. Structure and function of the HIV envelope AIDS 3: S35.

McKeating, J. A., P. D. Griffiths, and R. A. Weiss. 1990. HIV susceptibility conferred to human fibroblast by cytomegalovirus-induced Fc receptor. Nature 343: 659.

McKnight, A., R. A. Weiss, C. Shotton, et al. 1995. Change in tropism upon immune escape by human immunodeficiency virus. J. Virol. 69: 3167-3170.

McNearney, T., P. Westervelt, B. J. Thielan, B. D. Trowbridge, J. Garcia, R. Whittier, and L. Ratner. 1990. Limited sequence heterogeneity among biologically distinct HIV isolates from individuals involved in a clustered infectious breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1917.

Meyerhans, A., R. Cheynier, J. Albert, et al. 1989. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV Isolations. *Cell*. 58: 901-910.

Michael, N. L., V. Maryanne, D. S. Burke, and R. R. Redfield. 1992. Viral DNA and mRNA expression correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in humans: Evidence for viral replication in all stages of HIVdisease. *J. Virol.* 66: 310-316.

Miedema, F., L. Meyaard, M. Koot, et al. 1994. Changing virus-host interactions in the courses of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 140: 35-72.

Miller, M. D., M. T. Warmerdam, I. Gaston, W. C. Greene, and M. B. Feinberg. 1994. The human immunodeficiency virus type 1 *nef* gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 179: 101-113.

Miotti, P. G., G. Dallabetta, E. Ndovi, G. Liomba, A. J. Saah, and J. Chiphangwi. 1990. HIV-1 and pregnant women: associated factors, prevalence, estimate of incidence and role in fetal wastage in central Africa. *AIDS* 4: 733-736.

Morellet, N., N. Jullian, H. De Rocquigny, B. Maigret, et al. 1992. Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by  $^1\text{H}$  NMR. *EMBO. J.* 11: 3059.

Muesing, M. A., D. H. Smith, C. Cabradilla, C. V. Benton, L. Lasky, and D. J. Capon. 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313: 450.

Murphey-Corb, M., L. N. Martin, S. R. S. Rangan, et al. 1986. Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys. *Nature (London)* 321: 435-437.

Murphy, E., B. Korber, M. C. Geoges-Courbot, et al. 1993. Diversity of V3 region sequences of human immunodeficiency viruses type 1 from the Central African Republic. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9: 997-1006.

Myers, G., K. MacInness, and B. Korber. 1992. The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 373-386.

Myers, G., B. Korber, B. Hahn, et al. 1995. eds. *Human Retroviruses and AIDS 1995: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos, NM, Los Alamos National Laboratory.

**Nahmias, A. J., J. Weiss, X. Yao, et al.** 1986. Evidence for human infection with HTLV-III/LAV like virus Central Africa. *Lancet* i: 1279-1280.

**Narayan, O., and J. E. Clements.** 1989. The biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 70: 1617-1639.

**Nath, A., K. Psooy, C. Martin, K. Bodo, et al.** 1996. Identification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Epitope That Is Neuroexcitatory and Neurotoxic. *J. Virol.* 70: 1475-1480.

**Nebreda, A. R., T. Bryan, F. Segade, P. Wingfield, et al.** 1991. Biochemical and biological comparison of HIV-1 Nef and ras gene products. *Virology* 183: 151-159.

**Nelson, J. A., C. A. Willer, C. Reynolds-Kohler, C. E. Reese, W. Margaretten, and J. A. Levy.** 1988. human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from a patient with gastrointestinal symptoms. *Lancet* i: 259.

**Niederman, T. M., B. J. Thielan, and L. Ratner.** 1989. Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1128-1132.

**Nielsen, C., C. Pedersen, J. V. Garcia, W. R. Hastings, et al.** 1993. Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection. *AIDS* 7: 1035-1040.1993; 35

**Nui, M. T., D. S. Stein, and S. M. Schnittman.** 1993. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: Review of pathogenesis and early treatment intervention in humans and animal retrovirus infections. *J. Infec. Dis.* 168: 1490-1501.

**Nkengasong, J. N., W. Janssens, L. Heyndrickx, et al.** 1994. Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon. *AIDS* 8: 1405-1412.

**Nowak, M. A., S. Bonhoeffer, C. Loveday, P. Balfe, M. Semple, S. Kaye, M. Tenant-Flowers, and R. Tedder.** 1995. Results confirmed. *Nature* 375: 193.

**Ogawa, K., R. Shibata, T. Kiyomasu, I. Higuchi, Y. Kishida, A. Ishimoto, and A. Adachi.** 1989. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *J. Virol.* 63: 4110-4114.

**Ohta, Y., T. Masuda, H. Tsujimoto, et al.** 1988. Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates. *Int. J. Cancer* 41: 115-122.

- Ou, C. Y., Y. Takebe, B. G. Weniger, C. C. Luo, et al. 1993. Independent introduction of two major HIV-1 genotypes into distinct high-risk populations in Thailand. *Lancet* 341: 1171-1174
- Pan, L.-Z., A. Werner, and J. A. Levy. 1993. Detection of plasma viremia in human immunodeficiency virus-infected individuals at all clinical stages. *J. Clin. Microbiol.* 31: 283-288.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, L. Butini, P. A. Pizzo, S. M. Schnittman, D. P. Kotler, and A. S. Fauci. 1991. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9838-9842.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, and A. Fauci. 1993. The immunopathogenesis of human immunodeficiency infection. *N. Engl. J. Med.* 328: 327-335.
- Pantaleo, G. and A. S. Fauci. 1995a. New concepts in the immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 487-512.
- Pantaleo, G., O. J. Cohen, D. J. Schwzentruber, C. Graziosi, M. Vaccarezza, and A.S. Fauci. 1995b. Pathogenic insights from studies of lymphoid tissue from HIV-1 infected individuals. *J. Acq. Imm. Def. Synd. And Hum. Retro.* 10: S6-S14.
- Pape, J., and W. D. Jr. Johnson. 1993. AIDS in Haiti: 1982-1992. *Clin. Infect. Dis.* 17 (suppl2): S341-S345.
- Patel et coll., 1994; 2
- Peckham, C., and D. Gibb. 1995. Mother-to-child transmission of the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.* 333: 298-302
- Pedersen, C., B. O. Lindhardt, B. L. Jensen, et al. 1989. Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. *B.M.J.* 299: 154-157.
- Pedroza Martins, L., N. Chenciner, and S. Wain-Hobson. 1992. Complex inpatient sequence variation in the hypervariable regions of HIV-1 gp120 envelope sequence. *Virology* 191: 837-845.
- Peeters, M., C. Honore, T. Huet, L. Bedjabaga, S. Ossari, P. Bussi, R. W. Cooper, and E. Delaporte. 1989. Isolation and partial characterisation of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 3: 625-630.
- Peeters, M., G. M. Gershy-Damet, K. Fransen, et al. Virological and polymerase chain reaction studies of HIV-1/HIV-2 in Côte d'Ivoire. *Lancet* 340: 339-340.
- Peeters, M., K. Fransen, E. Delaporte, et al. 1992. Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate cpz-ant) from a wild-captured chimpanzee. *AIDS* 6: 447-451.

Peeters. M., W. Janssens, K. Fransen, J. Brandful, et al. 1994. Isolation of simian immunodeficiency viruses from two sooty mangabeys in Cote d'Ivoire: virological and genetic characterization and relationship to other HIV type2 and SIVsm:mac strains. *AIDS Rec. Hum. Retroviruses* 10: 1289-1294.

Peeters. M., W. Janssens, M. Vanden Haesevelde, et al. 1995. Virologic and serologic characteristics of natural chimpanzee lentivirus infection. *Virology* 211: 312-315.

Peliska, J. A., and S. J. Benkovic. 1992. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 258: 1112-1118.

Piatak Jr, M., M. S. Saag, L. C. Yang, et al. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259: 1749-1754.

Piette, A. M., F. Tusseau, D. Vignon, et al. 1986. Acute neuropathy coincident with seroconversion for anti-LAV/HTLV-III. *Lancet* i: 852.

Piot, P., and B. M. Kapita. 1991. *Aids in Africa*. JBO eds. London: Current Science ed.

Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar et al. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7415-7418.

Pokrovsky, V. V., I. Y. Eramova, V. P. Arzamastsev, et al. 1990. Epidemiology of human immunodeficiency virus (HIV) infection in the URSS. *Zhurnal. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol.* 2: 26-29.

Pomerantz, R. J., D. Trono, M. B. Felnberg, and D. Baltimore. 1990. Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. *Cell* 61: 1271-1276.

Potts M. 1992. *Aids in Africa Lancet* 339: 238,

Prestson, B. D., B. J. Poiesz, and L. A. Loeb. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242: 1168-1171.

Quershi, N. M., D. H. Coy, R. F. Garry, and L. A. Henderson. 1990. Characterization of putative cellular receptor for HIV-1 gp41 using synthetic peptides. *AIDS* 4: 553.

Quinn, T. C. and A.S. Fauci. 1994. The changing demography of AIDS: emergence of heterosexual transmission. In: K. J. Isselbacher, E. Braunwald, J. D. Wilson, and al., eds. *Harrison's principles of internal medicine*, suppl.9. New York : McGraw p. 1-9.

Quinn, T.C. 1994. Population migration and the spread of types 1 and 2 human immunodeficiency viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2407-2414.

Quinn, T.C. 1996. Global burden of the HIV pandemic. *Lancet* 348: 99-106.

Ramesy, C. A., and A. T. Panganiban. 1993. Replication of the retroviral terminal repeat sequence during *in vivo* reverse transcription. *J. Virol.* 67: 4114-4121.

Ranjbar, S., A. Slade, A. Jenkins, et al. Molecular characterization of an HIV type 1 from Burundi. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses* 11: 981-984.

Ratner, L., W. Haseltine, R. Patarca, et al. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature (London)* 313: 227-283

Rey, M. A., P. M. Girard, M. Harzic, et al. 1987. HIV-1 and HIV-2 double infection in French homosexual male with AIDS-related complex (Paris, 1985). *Lancet* i: 388-389.

Richman, D. D. and S. A. Bozzette. 1994. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J. Infect. Dis.* 169: 968-974.

Rizvi, T. A., and A. T. Panganiban. 1993. Simian immunodeficiency virus RNA is efficiently encapsidated by human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 67: 2681-2688.

Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242: 1171-1173.

Robertson, D. L., B. H. Hahn, and P. M. Sharp. 1995a. Recombination in AIDS viruses. *J. Mol. Evol.* 40: 249-259

Robinson, W. E., D. C. Montefiori, and W. M. Mitchell. 1990. Complement-mediated antibody-dependant enhancement of HIV-1 infection requires CD4 and complement receptor. *Virology* 175: 600.

Rusche, J. R., K. Jahavarian, C. Mcdanal, et al. 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3198-3202.

Sabino, E.C., E. G. Shpaer, M. G. Morgado, et al. 1994 Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B et F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J. Virol.* 68: 6340-6346.

- Safrit, J. T. , C. A. Andrews, T. Zhu, D. D. Ho, and R. A. Koup. 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: Recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope. *J. Exp. Med.* 179: 463-472.
- Sakai, H., R. Shibata, J.-I. Sakuragi, S. Sakuragi, M. Kawamura, and A. Adachi. 1993. Cell-dependant requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *J. Virol.* 67: 1663.
- Sattentau, Q. J. and J. P. Moore. 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* 174: 407
- Schnittman, S. M., J. J. Greenhouse, M. C. Psallidopoulos, et al. 1990. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann. Intern. Med.* 113: 438-443.
- Schubert, U., and K. Strebel. 1994. Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J. Virol.* 68: 2260-2271.
- Schuitmaker, H., M. Koot, N. A. Kootstra, et al. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: Progression of disease is associated with a shift from monocytoprotic to T-cell-tropic virus populations. *J. Virol.* 66: 1354-1360.
- Schultz, T. F., D. Whitby, J. G. Corrah, et al. 1990. Biological and molecular variability of Human immunodeficiency virus type 1 from Gambia. *J. Virol.* 64: 5177-5182.
- Scott, W. S., and J. D. Griffith. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5557.
- Sharp, P. M., D. L. Robertson, F. Gao, and B. H. Hahn. 1994. Origins and diversity of human immunodeficiency viruses. *AIDS* 8 (suppl 1): S27-S42.
- Sheppard, H.W., W. Lang, M. S. Ascher, E. Vittinghoff, and W. Winkelstein. 1993. The characterization of non progressors: Long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *AIDS.* 7: 1159-1166.
- Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer. 1991. Macrophage and T-cell line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* 349: 167.

Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer. 1992. Small amino-acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell line and macrophage tropisme of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9434-9438.

Simon, F., T. D. Ly, A. Baillou-Beaufils, et al. 1994. Sensitivity of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies. *AIDS* 8: 1628-1629.

Sinicco, A., G. Palestro, P. Caramello, et al. 1990. Acute HIV-1 infection : clinical and biological study of 12 patients. *Journal of AIDS*. 3: 260-265.

Sinicco, A., R. Fora, M. Sciandra, A. Lucchini, P. Caramello, and P. Gioannini. 1993. Risk of developping AIDS after primary acute HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune. Defec. Syndr.* 6: 575-581.

Skowronski, J., D. Parks, and R. Mariani. 1993. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO J.* 12: 703-713.

Smallman-Raynor M., and A. Cliff. 1990. The spread of human immunodeficiency virus type 2 into Europe: geographical analysis. *Int. J. Epidemiol.* 20: 480-489.

Sodroski, J., R. Patarca, C. A. Rosen, F. Wong-Staal, and W. A. Haseltine. 1985. Location of the trans-activating region of the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229: 74.

Sodroski, J., W. Goh, C. A. Rosen, A. Dayton, E. Terwilliger, and W. A. Haseltine. 1986. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321: 74

Soto-Ramirez, L. E., B. Renjifo, M. F. McLane et al. 1996. Langerhans cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 271: 1291-1293

Spina, C. A. T. J. Kwoh, M. Y. Chowes, et al. 1994. The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179: 115-123.

Stein, B. S., S. D. Lifson, R. C. Penhallow, K. G. Bensch, and E. G. Engelman. 1987. pH-independant HIV entry into CD4 positive T cells via fusion to the plasma membrane. *Cell* 49: 659.

Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M. A. Martin. 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 328: 728-730.

**Strebel, K., T. Klimkait, F. Maldarelli, and M. A. Martin.** 1989. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J. Virol.* 63: 3784-3791.

**Subramanyam, M., W. G. Gutheil, W. W. Bachovchin, and B. T. Huber.** 1993. Mechanism of HIV-1 Tat induced inhibition of antigen-specific T cell responsiveness. *J. Immunol.* 150: 2544-2553.

**Sullivan, N., M. Thali, C. Furman, D. D. Ho, and J. Sodroski.** 1993. Effect of amino-acid changes in the V1/V2 region of human immunodeficiency virus type 1 gp 120 glycoprotein on subunit association, syncytium formation, and recognition by neutralizing antibody. *J. Virol.* 67: 3674-3679.

**Tanese, N., A. Telesnitsky, and S. P. Goff.** 1991. Abortive reverse transcription by mutants of Moloney murine leukemia virus deficient in the reverse transcriptase-associated RNAase H function. *J. Virol.* 65: 4387-4397.

**Teich, N.** 1985. Taxonomy of retroviruses. IN: R. Weiss, N. Teich, H. Varmus, J. Coffin, 2nd edition. RNA tumor viruses. Cold spring Harbor, New York: Cold Spring Harbour Laboratory. p. 1-16.

**Temin, H. M.** 1993. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6900-6903.

**Tersmette, M., R. A. Gruters, F. De Wolf, et al.** 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: Studies sequential HIV isolates. *J. Virol.* 63: 2118-2125.

**Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y. Lu, G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5163-5167.

**Thali, M., C. Furman, E. Helseth, H. Repke, and J. Sodroski.** 1992. Lack of correlation between soluble CD4-induced shedding of the human immunodeficiency virus type 1 exterior envelope glycoprotein and subsequent membrane fusion events. *J. Virol.* 66: 5516.

**The Working Group on Mother-to-children transmission.** 1995. Rates of mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa, America, and Europe: results from 13 perinatal studies. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 8: 1495-1497.

**Tindall, B. and D. A. Cooper.** 1991. Primary HIV infection : host responses and intervention strategies. *AIDS* 5: 1-14.

**Todaro, G. J.** 1975. Evolution and modes of transmission of RNA tumor viruses. *Am. J. Pathol.* 81: 590-605.

**Traore, I. I. Thior, R. Marlink, et al.** Natural history of HIV-1 and HIV-2 in a cohort of West African female sex workers. IX International Conference on AIDS and STD in Africa. Kampala, december 1995. (abstract MOA006).

**Trono, D.** 1992. Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J. Virol.* 66: 4893-4900.

**Tsujimoto, H., A. Hasegawa, N. Maki, et al.** 1989. Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill. *Nature (London)* 341: 539-541.

**Tsujimoto, H., R. W. Cooper, T. Kodama, et al.** 1988. Isolation and characterisation of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 62: 4044-4050.

**Van den Haesevelde, M., J. L. Decourt, R. J. De Leys, et al.** 1994. Genomic cloning and complete sequence analysis of highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol.* 68: 1586-1596.

**Vincent, M. J., N. U. Raja, and M. Abdul-Jabbar.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induced degradation of chimeric envelope glycoproteins bearing the cytoplasmic and anchor domains of the CD4: role of the cytoplasmic domain in Vpu-induced degradation in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 67: 5538.

Viscidi et coll., 1989; 37

**Vogel, J., S. H. Hinrichs, R. K. Reynold, P. A. Luciw, and G. Jay.** 1988. The HIV Tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature* 335: 606.

**Von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, and D. Trono.** 1993. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* 67: 4945-4955.

**Wain-Hobson, S., P. Sonigo, O. Danos, and M. Alizon.** 1985. Nucleotide sequence of AIDS virus, LAV. *Cell* 40: 9.

**Walker, L., D. Wilks, J. O'Brien, J. Habeshaw, and A. Dalglish.** 1992. Localized conformational changes in the N-terminal domain of CD4 identified in competitive binding assay of monoclonal antibodies and HIV-1 envelope glycoprotein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1083-1090.

**Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, et al.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373: 117-122.

**Weiss, R.** 1993. How does HIV cause AIDS?. *Science* 1993, 260:1273-1278.

Weniger B., Y. Takebe, C. Ou, and S. Yamazaki. 1994. The molecular epidemiology of HIV in Asia. *AIDS* ; 8 (suppl2): S13-S28.

Werner, A., and J. A. Levy. 1993. Human immunodeficiency virus 1 envelope gp120 is cleaved after incubation with recombinant soluble CD4. *J. Virol.* 67: 2566-2574.

Wertervelt, P., H. E. Gendelman, and L. Ratner. 1991. Identification of a determinant within the human immunodeficiency virus 1 surface envelope glycoprotein critical for productive infection of primary monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3097-3101.

Westermann, J. and R. Pabst. 1990. Lymphocyte subsets in the blood : a diagnostic window on the lymphoid system. *Immunol Today.* 11: 406-410.

Westervelt, P., D. B. Trowbridge, L. G. Epstein, et al. 1992. Macrophage tropism determinants of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J. Virol.* 66: 2577-2582.

White, J. M. 1990. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 675.

Wiley, C. A., R. D. Schrier, J. A. Nelson, P. W. Lampert, and M. B. Oldstone. 1986. Cellular localisation of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. *P. N. A. S.* 83: 7089-7093

Willey, R. L., E. K. Ross, A. J. Buckler-White, T. S. Theodore, and M. A. Martin. 1989. Functional interaction of constant and variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* 63: 3595-3600

Willey, R. L., A. Buckler-White, and K. Strebel. 1994. Sequences present in the cytoplasmic domain of CD4 are necessary and sufficient to confer sensitivity to the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J. Virol.* 68: 1207-1212.

Willey, R. L., F. Madarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992a. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* 66: 226-234.

Willey, R. L., F. Madarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992b. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* 66: 7193-7200

Williams, L.M. and M.W. Cloyd. 1991. Polymorphic human gene(s) determines differential susceptibility of CD4 lymphocytes to infection by certain HIV-1 isolates. *Virology* 184: 723.

Wittle, H., J. Morris, J. Todd et al. 1994. HIV-2 infected patients survive longer than HIV-1 infected patients. *AIDS* 8 (Suppl2): S13-S38.

**Working Group on Mother-to-child Transmission of HIV.** 1995. Rates of mothers -to-child transmission of HIV-1 in Africa, America, and Europe: results from 13 perinatal studies. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 8: 1495-1497.

**Yahi, N., S. Baghdiguian, H. Moreau, and J. Fantini.** 1992. Galactosyl ceramide (or closely related molecules) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelia HT29 cells. *J. Virol.* 66: 4848

**Zazopoulos, E., and W. A. Haseltin.** 1993. Disulfide bond formation in the human immunodeficiency virus type 1 nef protein. *J. Virol.* 67: 1676-1680.

**Zhang, H., Y. Zhang, T. P. Spicer, L. Z. Abbott, and B. J. Poiesz.** 1993. Reverse transcription takes place within extracellular HIV-1 virions: potential biological significance. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9: 1287-1296

**Zhang, H., O. Bagasra, M. Niikura, B. J. Poiesz, and R. J. Pomerantz.** 1994. Intravirion reverse transcripts in the peripheral blood plasma on human immunodeficiency virus type 1 infected individuals. *J. Virol.* 68: 7591-7597.

**Zhao, L. J., S. Mukherjee, and O. Narayan.** 1994. Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr fuction. Specific interaction with a cellular protein. *J. Biol. Chem.* 269: 15577-1558

**Zack, J. A., S. J. Arrigo, S. R. Weitsman, A. S. Go, et al.** Hiv-1 entry intro quiscent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61: 213-222.

**Zhu, T., H. Mo, N. Wang, and al.** 1993 Genotype and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. *Science* 261: : 1179-1181.

**Zhu, T., and D. D. Ho.**1995. Was HIV present in 1959? *Nature (London).* 374: 503-504.

**Zhong, P. M. Peeters, W. Janssens, et al.** 1995. Correlation between genetic and biological properties of biologically cloned HIV type 1 viruses representing subtypes A, B, and D. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 11: 239248.

## RESUME

La caractérisation génétique récente de nombreux isolats VIH provenant de différentes zones géographiques a permis de subdiviser ces virus en deux groupes: le groupe M (pour "Major") contenant 9 sous-types génétiquement différents (A à I), et le groupe O (pour "Outlier") contenant les souches les plus divergentes. Les résultats actuels indiquent que la distribution des différents génotypes est hétérogène et que la prévalence relative de chacun des sous-types diffère selon les pays. La variabilité est présente au niveau des propriétés biologiques "in vitro".

La caractérisation moléculaire de virus isolés de patients militaires infectés par le VIH-1 lors de leur séjour en Outre-mer a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs sous-types A, B, C, D, E et F. L'analyse phylogénétique montre une grande hétérogénéité des souches, et fait apparaître deux sous-groupes au sein des groupes A et C. Différents motifs de la boucle V3 sont présents à l'intérieur d'un même sous-type.

L'analyse des phénotypes biologiques en fonction du nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et de la durée d'infection montre que l'apparition des souches SI est corrélée de façon significative à un faible taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et à une longue durée d'infection dans la majorité des cas et pour l'ensemble des sous-types étudiés. Cependant, on observe des exceptions suggérant que l'apparition des souches SI est associée aux propriétés virales d'une part et à l'état immunologique du patient d'autre part. La prédiction du phénotype à partir des acides aminés en position 11 et 25 de la boucle V3 est fiable dans la majorité des cas. Cependant, des discordances sont observées dans le cas des souches SI.

Ces résultats nous permettent d'envisager l'étude de l'histoire naturelle de l'infection à VIH-1 pour chaque sous-type et d'analyser l'impact des différents sous-types sur le pronostic de la maladie.

**Mots clés :** Virus de l'immunodéficience, Sous-types génétiques, Phénotype biologique, Durée d'infection, Nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup>, Phénotype prédit, Histoire naturelle du virus.