

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

*Discipline: Sciences de la Vie
Formation Doctorale: Biologie Santé
Ecole Doctorale: EDA 168*

Présentée et soutenue publiquement

Par

Avelin Aghokeng Fobang

Le 22 mai 2006

**Diversité génétique des lentivirus humains et simiens au
Cameroun:
implications pour la santé publique**

JURY

M. Bernard Lebleu	Professeur à l'Université Montpellier II, Président
M. François Simon	Professeur à l'Université de Rouen, Rapporteur
M. Souleymane Mboup	Professeur à l'Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Rapporteur
M. Léopold Zekeng	Directeur de Recherche, Représentant ONUSIDA, Freetown, Examineur
M. Michel Segondy	Maître de conférence, Praticien hospitalier, Montpellier, Examineur
Mme Martine Peeters	Directeur de Recherche, IRD, Montpellier, Directeur de thèse

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

*Discipline: Sciences de la Vie
Formation Doctorale: Biologie Santé
Ecole Doctorale: EDA 168*

Présentée et soutenue publiquement

Par

Avelin Aghokeng Fobang

Le 22 mai 2006

**Diversité génétique des lentivirus humains et simiens au
Cameroun:
implications pour la santé publique**

JURY

M. Bernard Lebleu	Professeur à l'Université Montpellier II, Président
M. François Simon	Professeur à l'Université de Rouen, Rapporteur
M. Souleymane Mboup	Professeur à l'Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Rapporteur
M. Léopold Zekeng	Directeur de Recherche, Représentant ONUSIDA, Freetown, Examineur
M. Michel Segondy	Maître de conférence, Praticien hospitalier, Montpellier, Examineur
Mme Martine Peeters	Directeur de Recherche, IRD, Montpellier, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Il m'est tout particulièrement agréable de remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'accomplir ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier le Docteur Martine Peeters, ma directrice de thèse, pour son encadrement exceptionnel depuis mon arrivée au sein du laboratoire, autant pour l'initiation à la recherche scientifique que pour la rédaction des articles et de ce manuscrit. Sa rigueur dans le travail fait d'elle un encadreur hors pair.

Toute ma reconnaissance au Docteur Léopold Zekeng qui a guidé mes premiers pas dans le monde de la recherche.

Je suis très honoré par la présence dans ce jury des Professeurs Souleymane Mboup et François Simon qui ont examiné ce travail et apporté leurs commentaires en tant que rapporteurs. Je voudrais également témoigner ma reconnaissance aux Docteurs Léopold Zekeng et Michel Segondy d'avoir accepté d'être examinateurs. Je remercie le Professeur Bernard Lebleu d'avoir accepté de présider ce jury.

Ma gratitude va aussi à tous les membres du laboratoire Rétrovirus, tout particulièrement à Florian, Christian, Nicole, Laurence, Christelle, Monique, Sabrina, Céline, Fran, Anke, Nadia et Audrey.

Je tiens également à remercier tous mes amis et collègues des laboratoires voisins, tout particulièrement Adriano qui comme moi traverse une période assez spéciale actuellement. Merci à Salima, Nelly, Milagros, Olivia et Sébastien. Un grand merci à Bruno pour son soutien et son aide pour l'accès au Centre.

Merci à l'IRD pour le financement de ces trois années de thèse.

Je remercie toute ma famille, en adressant ma plus sincère reconnaissance à mes parents, ma maman, mon papa qui n'est plus là aujourd'hui, mes frères et sœurs, Carole, Lucie, Joëlle, Paulin et Berthold.

*J'aimerais tout spécialement adresser
à une personne exceptionnelle mon éternelle reconnaissance pour m'avoir
donné l'occasion et les moyens de réaliser ce travail. Je suis
initialement arrivé au laboratoire Rétrovirus pour un stage de trois
mois, cela fait aujourd'hui plus de quatre ans que j'y suis encore.
Merci de tout mon cœur Professeur Eric Delaporte.*

A ma maman et à mon fils Eric.

ABBREVIATIONS

AA:	Acide aminé
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
AGM:	African Green Monkey
AMV:	Avian Myeloblastosis Virus
ANRS:	Agence Nationale de Recherches sur le SIDA
APOBEC3G:	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
ARN:	Acide Ribonucléique
ARV:	Antirétroviraux
AZT:	3'-azido-2',3'-didéoxythymidine
CDC:	Center for Disease Control
CDn:	Cluster of Differentiation n
CMV:	CytoMegalo Virus
CNLS:	Comité National de Lutte contre le SIDA
CRF:	Circulating Recombinant form
CTL:	Cytotoxic T Lymphocytes
CY:	Cytoplasmique
DO:	Densité Optique
ELISA:	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FDA:	Food and Drug Administration
FP:	Fusion Peptide
gp:	glycoprotéine
GSN:	Greater Spot-Nosed
HAART:	Highly Active Antiretroviral Therapy
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
HLA:	Human Leucocyte Antigen
HR:	Heptad Repeat
HTLV:	Human T-lymphotropic Virus
IC:	Inhibitory Concentration
ID:	Immunodominant
IF:	Inhibiteur de fusion
IgG:	Immunoglobulin G
INRT :	Inhibiteur Nucléosidique de la Reverse Transcriptase
INNRT:	Inhibiteur Non-Nucléosidique de la Reverse Transcriptase
IP:	Inhibiteur de la Protéase
kb:	kilobase
LIA:	Line Immuno Assay
LAV:	Lymphadenopathy AIDS Virus
LTR:	Long Terminal Repeat
M-MuLV:	Moloney Murine Leukemia Virus
NERPRC:	New England Regional Primate Research Center
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA:	Organisation des Nations Unies sur le SIDA
PAGE:	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
pb:	paire de bases
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS:	Phosphate-Buffered Saline

PCR:	Polymerase Chain Reaction
PPTE:	Pays Pauvres Très Endettés
rgp:	recombinant glycoprotein
RCA:	République Centrafricaine
RDC:	République Démocratique du Congo
RT:	Reverse Transcriptase
SIDA:	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SIV:	Simian Immunodeficiency Virus
STLV:	Simian T-lymphotropic Virus
sp:	species
SVF:	Sérum de Veau Fœtal
TM:	Transmembrane
TMB:	3'3',5,5'-Tetramethyl benzidine

Listes des Acides Aminés

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

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
ABREVIATIONS.....	4
TABLES DES MATIERES	6
INTRODUCTION.....	11
I. GENERALITES.....	12
A. Les lentivirus de primates.....	12
1. Définitions et classifications.....	12
B. Découverte des lentivirus humains et simiens.....	14
1. Identification des 1ers cas de SIDA et de l'agent causal.....	14
2. Identification des 1er homologues simiens du HIV: le SIV.....	14
C. Taxonomie et classification	15
D. Structure et organisation génomique	15
1. La particule virale	15
2. Organisation du génome.....	16
* Rôles des gènes accessoires.....	18
E. Réplication virale	19
1. Entrée et intégration.....	19
2. Expression des gènes	20
3. Assemblage et maturation.....	20
F. Physiopathologie	20
II. EPIDEMIOLOGIE, DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT DE L'INFECTION A HIV.....	22
A. Epidémiologie de l'infection à HIV.....	22
1. Situation actuelle.....	22
B. Diagnostic de l'infection à HIV	24
1. Objectifs du dépistage HIV	24
2. Les marqueurs de l'infection	24
3. Le diagnostic sérologique.....	25
4. Les tests de confirmation	26
C. Traitement de l'infection à HIV.....	29

1.	Classes de molécules antirétrovirales.....	29
☞	Les analogues nucléosidiques de la RT	30
☞	Les Inhibiteurs non-nucléosidiques de la RT	30
☞	Les inhibiteurs de la protéase	30
★	Nouvelles approches antirétrovirales.....	30
☞	Les inhibiteurs de l'intégrase	30
☞	Les inhibiteurs d'attachement et d'entrée	31
★	L'immunothérapie.....	32
III.	DIVERSITE GENETIQUE DES LENTIVIRUS DE PRIMATES ET SES CONSEQUENCES	33
A.	Les causes de la variabilité génétique.....	33
1.	Infidélité de la reverse transcriptase.....	33
2.	Dynamique de la réplication virale	34
3.	La recombinaison.....	34
4.	La pression sélective.....	34
B.	Les variants génétiques du HIV	36
1.	Le groupe M (Major).....	36
2.	Les groupes O et N (Outlier & New).....	37
3.	Les formes recombinantes	37
4.	Diversité génétique du HIV-2.....	38
5.	Distribution géographique des variants HIV-1	39
C.	Conséquences de la variabilité génétique du HIV	42
1.	Implications sur le diagnostic	42
2.	Conséquences sur le traitement	42
3.	Impact sur la transmission et l'évolution de la maladie	43
➤	Impact sur la transmission périnatale	44
➤	Impact sur la progression de la maladie	44
4.	Les chances d'un vaccin	45
IV.	LES LENTIVIRUS SIMIENS ET L'ORIGINE DU HIV.....	47
A.	Origine du HIV.....	47
1.	Du SIVcpz au HIV-1	47
2.	Du SIVsm au HIV-2	50
B.	Diversité génétique et évolution des SIV	52
1.	Grands singes et infection à SIV	52
2.	Infections à SIV chez les petits singes	55

3. Phylogénie des lentivirus des primates	55
4. Infection à SIV chez les cercopithèques	61
C. Pathogénicité des lentivirus simiens	63
D. Les risques de nouvelles zoonoses	64
V. CAS PARTICULIER DU CAMEROUN	66
A. Particularité de la diversité génétique du HIV au Cameroun.....	66
B. Accès au diagnostic et au traitement	67
1. Accès au diagnostic.....	67
2. Accès au traitement.....	68
C. SIV chez les primates au Cameroun.....	69
D. Viande de brousse et santé publique au Cameroun	69

TRAVAUX DE THESE.....	71
✎ OBJECTIF PRINCIPAL	72
PARTIE 1: HIV.....	73
✎ OBJECTIFS.....	74
CHAPITRE I: Evaluation des outils de diagnostic du HIV au Cameroun	77
I. Contexte de l'étude	78
II. Matériel et Méthodes	78
III. Résultats	79
IV. Discussion et Conclusion.....	80
V. Publication.....	81
CHAPITRE II: Diversité génétique et résistances primaires au Cameroun.....	91
A. Polymorphisme des souches non-B et application des algorithmes d'interprétation de résistances génotypiques aux ARV	92
I. Contexte de l'étude	92
II. Matériel et Méthodes	92
III. Résultats	93
IV. Discussion et Conclusion.....	95
V. Publication.....	96
B. Diversité génétique au Cameroun et sensibilité du T20.....	107
I. Contexte de l'étude	107
II. Mécanisme d'action du T20	107
III. Matériel et Méthodes	108
IV. Résultats	108
V. Discussion et Conclusion.....	109
VI. Publication.....	109

PARTIE 2: SIV.....	114
✍ OBJECTIFS.....	115
CHAPITRE I: Développement d'outils sérologiques pour la détection de nouveaux Lentivirus et évaluation des prévalences de l'infection à SIV chez les primates non-humains	117
I. Introduction	118
II. Matériel et Méthodes	120
III. Résultats	125
IV. Discussion	134
V. Publication.....	139
CHAPITRE II: Caractérisation de SIV chez les primates fréquemment chassés et consommés au Cameroun.....	156
A. Cas des moustacs (<i>Cercopithecus cephus</i>)	157
I. Introduction	157
II. Matériel et Méthodes	159
III. Résultats	164
IV. Discussion	177
V. Publication.....	181
B. Cas des mandrills (<i>Mandrillus sphinx</i>)	182
I. Introduction	182
II. Matériel et Méthodes	185
III. Résultats	189
IV. Discussion	199
V. Publication.....	204
CONCLUSION.....	205
BIBLIOGRAPHIE.....	210

INTRODUCTION

I. GENERALITES

A. LES LENTIVIRUS DE PRIMATES

1. Définitions et classifications

Les virus sont des entités nucléo-protéiques ne possédant qu'un seul type d'acide nucléique (ARN ou ADN), ils sont reproduits par la cellule à partir de leur matériel génétique et sont incapables de croître et de se diviser (241). Selon leur morphologie, leur composition génomique et leur mode de répllication, les virus ont été classés en familles, sous-familles et genres. Ainsi, les rétrovirus (*Retroviridae*) sont une famille de virus largement répandue chez les mammifères et dont le matériel génétique est l'ARN. Les virus appartenant à la famille des *Retroviridae* ont été précédemment classés sur la base de leur pathogénicité et de leur morphologie en trois sous-familles: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* et *Spumavirinae*.

La nouvelle taxonomie des *Retroviridae* est basée sur l'organisation génomique et l'évolution phylogénétique. Leur structure génomique est soit simple ou complexe (84): les rétrovirus simples portent habituellement des informations élémentaires codées par les gènes de structure, enzymatique et d'enveloppe alors que le génome des rétrovirus complexes code en plus pour des protéines de régulation. Sur la base de leur évolution phylogénétique, les rétrovirus peuvent être divisés en sept genres (*Spumavirus*, *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* et *Lentivirus*) comme présenté sur la Figure 1 (84). Les *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* et *Epsilonretrovirus* induisent chez leurs hôtes des tumeurs et leucémies, alors que jusqu'à présent aucune pathologie n'a été attribuée aux *Spumavirus*. Quant aux *Lentivirus*, ils provoquent des pathologies à évolution lente dont la progression peut s'étendre sur plusieurs années avant l'apparition de symptômes cliniques identifiables et l'état de maladie. Depuis 1950, plusieurs *Lentivirus* ont été identifiés chez des mammifères; le virus du *Maedi visna* (VMV) du mouton, premier lentivirus identifié en 1950 par Bjorn Sigurdsson, le virus de l'anémie infectieuse du cheval (EIAV), le virus de l'arthrite et encéphalite de la chèvre (CAEV) et les virus responsables de l'immunodéficience chez le bovin (BIV) et chez les félins tels que le chat (FIV). Les plus récemment découverts sont les *Lentivirus* de primates, HIV et SIV respectivement responsables de l'immunodéficience humaine et simienne et qui constitueront le principal sujet de cette thèse.

B. DECOUVERTE DES LENTIVIRUS HUMAINS ET SIMIENS

1. Identification des 1^{ers} cas de SIDA et de l'agent causal

En 1981, M. Gottlieb à Los Angeles a observé une pneumonie à *Pneumocystis carinii* chez un sujet masculin jeune. Ce patient présentait un effondrement d'une sous-population lymphocytaire, les lymphocytes T4+. En quelques semaines aussi bien à Los Angeles qu'à New York, d'autres cas de pneumocystose parfois associés à un sarcome de Kaposi vont être répertoriés chez des hommes jeunes, tous homosexuels. Par la suite, d'autres cas de manifestations cliniques similaires vont être observés aux USA chez des polytransfusés, des héroïnomanes et autres toxicomanes. L'hypothèse d'un agent infectieux transmissible par le sang et par voie sexuelle va commencer à émerger. C'est en 1983, dans le laboratoire du Professeur Montagnier à l'Institut Pasteur de Paris que va être isolé pour la première fois le virus responsable du SIDA, le HIV, à partir de cellules d'un ganglion prélevé chez un sujet homosexuel de retour des USA et présentant des lymphadénopathies. Le nouveau virus va être baptisé LAV pour Lymphadénopathie Associated Virus (42, 79). En 1984, l'équipe du Professeur Gallo isole à son tour le virus responsable du SIDA qu'elle va appeler HTLV-III (348). De son côté l'équipe du Professeur Levy à San Francisco isole également le virus sous le nom de ARV (AIDS Related Virus) (227). La situation devient assez confuse dans la littérature où le virus est tantôt appelé LAV, HTLV-III, ou ARV. Le comité de nomenclature internationale des virus va finalement attribuer le nom de HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus 1) au virus qui cause le SIDA (323). Des études moléculaires ont indiqué que le HIV-1 est tout à fait distinct des virus HTLV et qu'il s'agit non pas d'un oncovirus, mais d'un lentivirus. Enfin, le second virus responsable du SIDA est isolé en 1986 à l'Institut Pasteur par le Professeur Luc Montagnier chez deux malades d'origine portugaise ayant longtemps séjourné en Afrique de l'ouest et présentant un SIDA. Ce virus apparenté au HIV-1 est différent au niveau de ses protéines de surface et est appelé HIV-2 (82).

2. Identification des 1^{er} homologues simiens du HIV: le SIV

La découverte du HTLV-III du Professeur Gallo va coïncider avec l'isolation en 1984 d'un STLV-III, par homologie à HTLV-III, d'un macaque rhésus (*Macaca mulatta*) du New England Regional Primate Research Center (NERPRC) (105). Le virus fut initialement baptisé STLV-III à cause de ses propriétés morphologiques, antigéniques et ses caractéristiques de croissance similaires à celles du virus responsable de l'immunosuppression chez l'homme récemment décrit et nommé HTLV-III, LAV ou ARV. Lorsque le HTLV-III

est finalement nommé virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1), le STLV-III est logiquement rebaptisé virus de l'immunodéficience simienne (SIV). Des études rétrospectives montreront que le virus de l'immunodéficience simienne avait été introduit au NERPRC via un groupe de singes rhésus atteints d'une maladie immunosuppressive et provenant d'un autre centre de primatologie 15 ans plutôt. Ce groupe initial ayant été à son tour probablement infecté en captivité par un SIV d'un mangabey enfumé capturé dans la nature. Après l'isolation des 1^{er} SIV des macaques rhésus, d'autres SIVs vont être isolés chez d'autres espèces de macaques vivant en captivité (*M. fascicularis*, *M. nemestrina*, *M. arctoides*) et décédant de maladies associées à une immunosuppression.

C. TAXONOMIE ET CLASSIFICATION

HIV et SIV appartiennent au genre *Lentivirus* de la famille des *Retroviridae* qui se définissent par leur structure et surtout par leur mode de répllication. Ces virus à ARN, de 80 à 120 nm de diamètre, vont grâce à l'enzyme qu'ils transportent, la reverse transcriptase (RT), avoir leur génome rétrotranscrit en ADN viral qui peut alors s'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte sous le nom de provirus. Ce cycle répllicatif est commun à l'ensemble de la famille des *Retroviridae* (85). Les lentivirus des primates, HIV et SIV, se caractérisent par leur tropisme pour les lymphocytes CD4+.

D. STRUCTURE ET ORGANISATION GENOMIQUE

1. La particule virale

Les lentivirus de primates (HIV et SIV) après avoir été libérés par bourgeonnement à la surface des cellules qui les produisent, sont des particules de 80 à 120 nanomètres de diamètre avec une enveloppe hérissée de spicules (65) (Figure 2).

Le core viral comprend deux brins d'ARN identiques, trois protéines et des enzymes virales : la reverse transcriptase (RT), l'intégrase et la protéase. La capsid virale est constituée de la protéine interne dite majeure, car la plus abondante, d'un poids moléculaire de 24 kDa : la p24 CA. La protéine de nucléocapside (p7 NC) est associée aux molécules d'ARN. La protéine de matrice p17 MA est la plus externe et est associée à la troisième enzyme virale, la protéase.

L'enveloppe virale est formée d'une double couche lipidique d'origine cellulaire et de deux glycoprotéines virales : la glycoprotéine transmembranaire qui traverse la couche

lipidique et est liée par des liaisons faibles à la glycoprotéine de surface, l'ensemble faisant saillie à la surface du virus sous forme de spicules qui correspondent à des trimères de ces deux glycoprotéines. Cette structure est commune à tous les lentivirus de primates et seuls changent les poids moléculaires des protéines et enzymes constitutives.

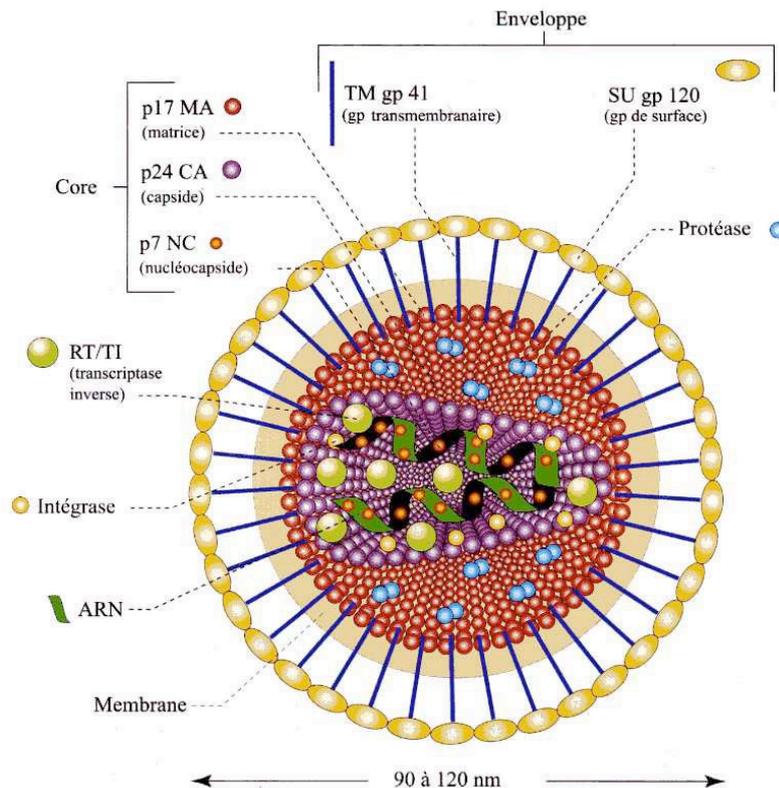


Figure 2. Structure d'une particule HIV-1 (*Traité de Virologie Médicale. J.M. Huraux, éditions Estem, 2003*).

2. Organisation du génome

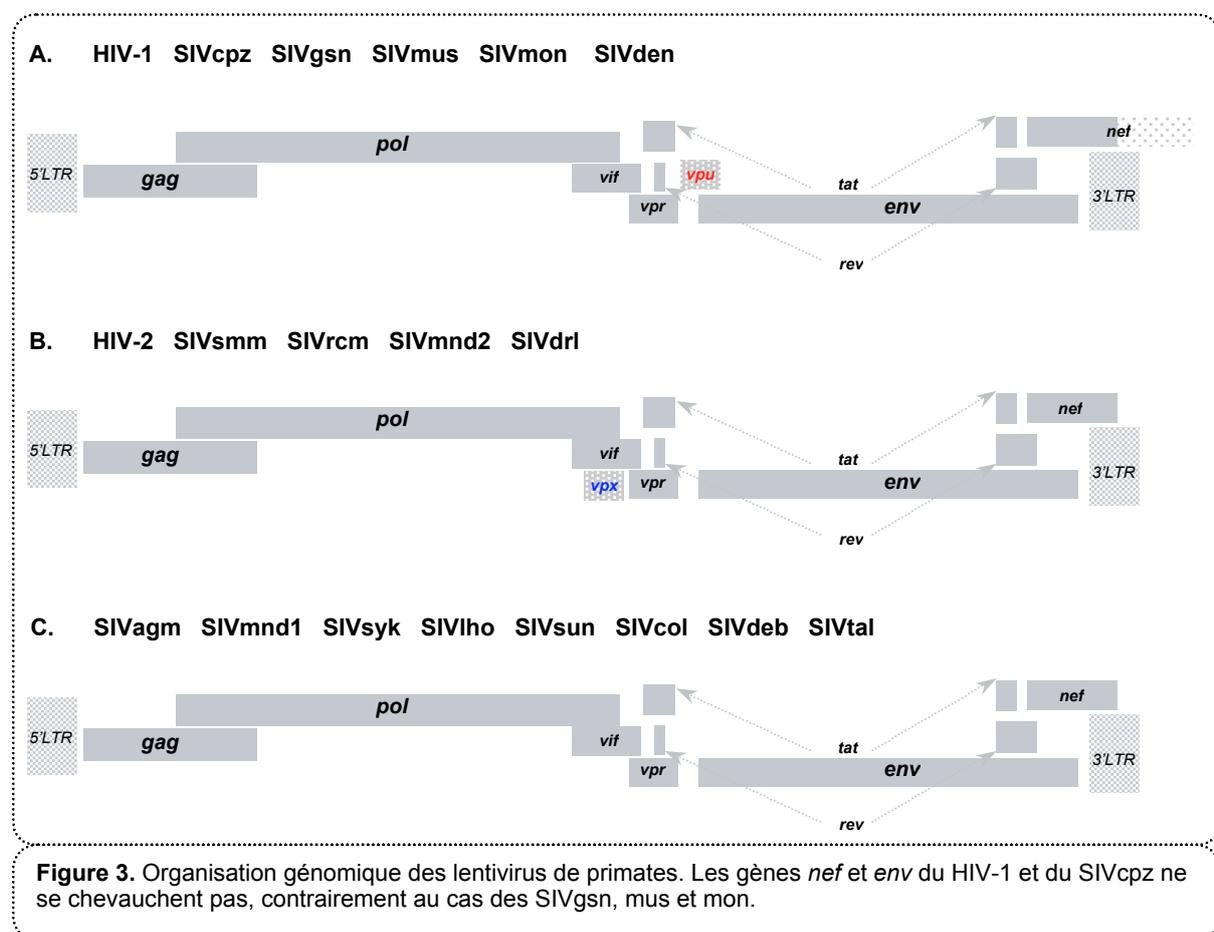
Le génome des HIV et SIV a une longueur de l'ordre de 9000 nucléotides flanqué à chaque extrémité par des séquences répétitives, qui après retrotranscription donneront les LTR (long terminal repeat). Ces LTR sont essentiels à l'intégration du virus et sa transcription. Comme tous les rétrovirus, les HIV et SIV ont trois principaux gènes de structure, *gag*, *pol*, et *env*, codant respectivement pour les protéines internes, les trois enzymes virales et les glycoprotéines d'enveloppe. L'organisation de ce génome est complexe car, aux gènes de structure s'ajoutent des gènes supplémentaires situés dans la partie centrale du génome et à l'extrémité 3', appelés gènes accessoires, qui jouent pour la plupart un rôle de régulation de l'expression virale : *vif*, *vpr*, *vpx*, *vpu*, *tat*, *rev*, et *nef*. Tous les lentivirus de primates ont en commun 5 gènes accessoires (*vif*, *rev*, *tat*, *vpr* et *nef*) qui en général se

chevauchent et chevauchent d'autres gènes du génome (*tat* et *rev* sont constitués de 2 exons qui chevauchent *env*). La présence de deux autres gènes accessoires (*vp_x* ou *vp_u*) est variable. Sur la base de cette organisation génomique, on peut distinguer trois groupes de lentivirus de primates (Figure 3):

➤ Le premier groupe comprend des virus possédant un *vp_u* et a pendant longtemps été représenté uniquement par le HIV-1 et le SIV du chimpanzé (SIVcpz). Ce n'est que récemment que d'autres virus possédant un *vp_u* ont été caractérisés chez les primates du genre *Cercopithecus* (voir section *les lentivirus simiens et l'origine du HIV*) (Figure 3A).

➤ Le second groupe formé par les virus possédant un *vp_x*, comprend le HIV-2 et des SIV isolés des singes appartenant à la tribu *Papionini*: le mangabey enfumé (SIVsmm), le cercocèbe à collier blanc (SIVrcm), le mandrill (SIVmnd2) et le drill (SIVdrl) (Figure 3B).

➤ Enfin, le troisième groupe est composé de virus n'ayant ni *vp_x*, ni *vp_u* et comprend des lentivirus simiens isolés de différents petits singes tels que le singe vert d'Afrique (SIVagm), le colobe guéréza (SIVcol), le singe de Brazza (SIVdeb) ... (Figure 3C).



★ Rôles des gènes accessoires

Les gènes accessoires codent pour les protéines dites régulatrices, car elles interviennent dans la régulation du cycle réplcatif et interagissent avec des facteurs cellulaires. Ces protéines semblent également modifier l'expression des gènes cellulaires, altérant ainsi le bon fonctionnement des cellules infectées, ce qui favorise l'infectiosité et la pathogénicité des lentivirus de primates. Bien que n'ayant pas toutes été identifiées et ne faisant pas toujours l'unanimité, la majorité des fonctions jouées par ces protéines chez les lentivirus de primate a été étudiée sur le modèle animal, particulièrement grâce aux virus mutants (SIVmacΔ par exemple). Les principales fonctions connues chez le HIV-1 sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Protéines accessoires du HIV-1 et leurs fonctions

Protéines accessoires	Fonctions
Vif « <i>viral infectivity factor</i> »	p23 La protéine Vif est impliquée dans diverses fonctions dont les principales sont essentielles à la reproduction et l'infectiosité virale (206,379). Elle est impliquée dans la neutralisation de l'APOBEC3G, une enzyme à activité antiretrovirale (91,251,363,376,445). Vif stabilise aussi le complexe nucleoprotéique à travers son interaction avec la région 5' de l'ARN du HIV-1 (290,368). Elle est aussi impliquée dans la modulation de la RT virale (67).
Vpr « <i>viral protein R</i> »	p15 Elle est impliquée dans de multiples fonctions durant la r éplication virale: transport vers le noyau du complexe de pre-intégration (86,164), interférence avec le cycle de multiplication cellulaire (regulation G2/M) (119,163,196). Elle induit l'apoptose (11,184) et régule la transactivation du LTR-HIV-1 et des gènes de la cellule hôte (448).
Tat « <i>transactivator of transcription</i> »	p14 La protéine Tat est essentielle dans la transcription optimale des gènes viraux et la réplication virale, entre autres par la transactivation de la transcription LTR-dépendante qui se traduit par une remarquable augmentation de l'expression des gènes viraux (205,322,450). Tat favorise la r éplication virale aussi en ajustant l'activité de la polymérase II (55,425) et par transactivation des RNA de HIV-1 à travers l'activation du NF-κB (115).
Rev « <i>regulator of expression of the virion</i> »	p19 Elle est responsable du transport vers le cytoplasme des mARN épissés et non-épissés nécessaires pour l'expression des protéines structurales du HIV et la production de l'ARN génomique (247). Elle est aussi impliquée dans la stabilisation et la traduction de l'ARN du HIV (28,129), augmente la durée de vie des ARN viraux dans le noyau (246) et inhibe les molécules inhibitrices du transport cytoplasmique (296).
Nef « <i>negative regulator factor</i> »	p27 Les premières études ont rapporté un effet négatif de nef sur la réplication virale, d'où son nom de «facteur négatif» (8,78). Cependant, des études récentes ont démontré le rôle important de Nef dans plusieurs étapes de la réplication virale. Elle affecte l'expression en surface de plusieurs protéines cellulaires; sous-régule les CD4 (146), CD8 (377), CD28 (382), les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (355) et classe II (352). Elle interfère avec les voies de transduction de signaux cellulaires (422), accroît l'infectivité des virions et la réplication virale (80) et enfin elle régule les transports de cholestérol vers les cellules infectées par le HIV (449).
Vpu « <i>viral protein U</i> »	p16 Cette petite protéine de 9 kDa favorise la libération des virions des cellules infectées (61) et induit la dégradation des récepteurs CD4 (250,429)

E. REPLICATION VIRALE

Le cycle répliatif des lentivirus de primates peut être divisé en trois principales étapes : (i) l'entrée et l'intégration, (ii) l'expression des gènes et (iii) l'assemblage et la maturation (Figure 4).

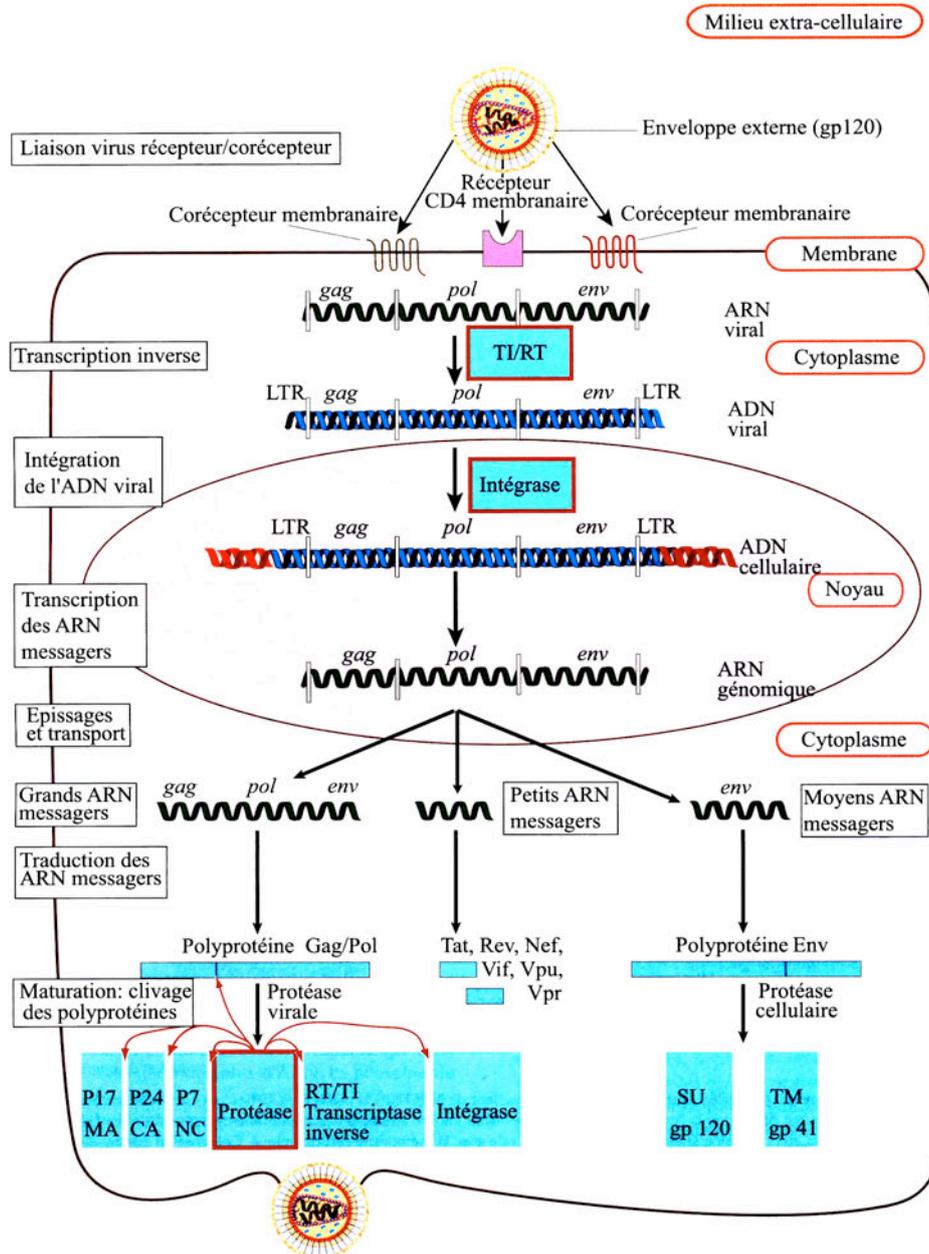


Figure 4. Cycle répliatif des HIV (*Traité de Virologie Médicale. J.M. Huraux, éditions Estem, 2003*).

1. Entrée et intégration

L'entrée d'une particule HIV-1 à l'intérieur d'une cellule cible se fait par le biais de l'interaction glycoprotéines virales (gp120 et gp41)/récepteur (CD4) et co-récepteurs (CCR5

et CXCR4) cellulaires. Cette interaction conduit à la fusion de la membrane virale et de la membrane cellulaire, suivie par la libération du génome viral dans le milieu intracellulaire. Grâce à l'enzyme RT, l'ARN viral est transcrit en ADN complémentaire (ADNc). La RT dégrade l'ARN viral et copie l'ADN viral monocaténaire en ADN double brin qui passe dans le noyau cellulaire. L'ADN viral s'intègre par la suite à l'ADN chromosomique de la cellule infectée grâce à l'intégrase virale et devient l'ADN proviral. Ainsi s'achève le processus d'entrée et d'intégration, qui sera suivi par l'expression de l'ADN intégré.

2. Expression des gènes

L'expression de l'ADN viral est étroitement conditionnée par l'état d'activation de la cellule et l'interaction des protéines virales de régulation (Tat et Rev). L'ARNm viral est traduit dans le cytoplasme et donne naissance à des polyprotéines virales codées d'une part par les gènes *gag* et *pol* et d'autre part par *env*. S'ensuivent alors l'assemblage et la maturation.

3. Assemblage et maturation

La polyprotéine Env va être clivée par une protéase cellulaire en deux protéines d'enveloppe qui seront glycolysées par les enzymes cellulaires. L'assemblage des protéines virales et de deux molécules d'ARN viral au niveau de la membrane cellulaire se fera grâce aux protéines Vpu et Vif. Quant à la polyprotéine Gag-Pol, c'est au moment du bourgeonnement du virus hors de la cellule qu'elle va être clivée par la protéase virale pour donner les protéines constitutives internes du virus et ses trois enzymes.

F. PHYSIOPATHOLOGIE

La disparition progressive des lymphocytes CD4 + est la conséquence majeure de l'infection par le HIV, d'où l'appellation "*immunodéficience*". Le HIV et le SIV se propagent majoritairement dans les lignées cellulaires CD4 +, mais à plus de 99% dans les lymphocytes CD4 +. Les autres lignées cellulaires exprimant la molécule CD4 (monocytes sanguins, macrophages tissulaires et cellules dendritiques) sont moins couramment infectées que les lymphocytes CD4 et jouent beaucoup plus le rôle de réservoir du virus.

Comme c'est le cas pour le HIV, l'infection avec le SIV est largement dépendante du récepteur CD4, mais la molécule CD4 à elle seule ne suffirait pas à assurer une infection efficace des cellules. Certains récepteurs de chimiokines jouent le rôle de corécepteurs et sont

indispensables à une infection efficace par le HIV et le SIV, principalement les corécepteurs CCR5 et CXCR4 (12, 116, 130). Ces co-récepteurs sont des récepteurs à chimiokines, membres de la superfamille des cytokines et sont classés suivant la séparation des cystéines conservées, soit par un acide aminé (CXC ou α -chimiokines), soit par aucun (CC ou β -chimiokines). L'usage de ces corécepteurs a conduit à la distinction actuelle de plusieurs catégories de souches HIV en fonction de leur tropisme. Les virus à tropisme macrophagique, ou virus à tropisme M ou virus R5, utilisent le corécepteur CCR5 et sont peu cytopathogènes. Les virus à tropisme lymphocytaire, encore appelés à tropisme T ou virus X4, utilisent le corécepteur CXCR4 et sont cytopathogènes. Certains isolats sont à double tropisme M et T, avec l'usage des 2 co-récepteurs (R5X4). Dans la très grande majorité des primo-infections, de même que chez les sujets asymptomatiques, les souches virales R5 prédominent, alors que les virus X4 sont isolés essentiellement de patients au stade clinique de SIDA (48). Des études génétiques ont montré que les sujets homozygotes pour la délétion $\Delta 32$ du gène CCR5 ne seraient pas infectables par le HIV-1 (environ 1% de la population caucasienne) (342). Cependant, de rares cas de patients $\Delta 32/\Delta 32$ développant la maladie ont été décrits, avec un rapide déclin des CD4 (57, 364). Les isolats HIV-1 provenant de ces patients utilisent exclusivement le co-récepteur CXCR4. Les sujets hétérozygotes pour $\Delta 32$ seraient infectables, mais évolueraient moins rapidement vers la maladie. L'usage du co-récepteur dicte le phénotype biologique (48), ainsi les souches utilisant CXCR4 (X4) induisent la formation de syncytia (SI, Syncytium Inducing), alors que les souches utilisant CCR5 (R5) n'induisent pas la formation des syncytia (NSI, Non-Syncytium Inducing).

La plupart des SIV infectant naturellement les primates non-humains utilisent le corécepteur CCR5 (64, 74). Cependant, chez certains primates comme le cercocèbe à collier blanc, une délétion du gène CCR5 entraîne l'utilisation des corécepteurs CCR2B et CXCR6 (46, 75). Des SIV comme le SIV_{mnd1} du mandrill utilisent le corécepteur CXCR4 et non-le CCR5 (353). D'autres co-récepteurs comme CCR2, CCR3, BOB (encore appelé GPR15), Bonzo (ou STRL33), GPR1 et US28 sont également utilisés par certaines souches SIV et HIV-1 (74). Cependant, aucune corrélation n'a été établie entre le corécepteur utilisé et la pathogenèse *in vivo* chez les primates non-humains.

II. EPIDEMIOLOGIE, DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT DE L'INFECTION A HIV

A. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A HIV

1. Situation actuelle

Fin 2005, l'ONUSIDA estimait à 40,3 (36,7 – 45,3) millions le nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le HIV, soit 1 personne sur 150 dans le monde (292) (Figure 5). Avec plus de 25 millions de personnes vivant avec le HIV, l'Afrique et plus particulièrement l'Afrique subsaharienne est la région du monde la plus touchée par la pandémie. Cette partie de l'Afrique n'abrite guère plus de 10% de la population mondiale mais près de 70% du total des personnes infectées par le HIV. La diversité des niveaux et tendances de l'infection est considérable sur ce continent. Les pays de l'Afrique australe connaissent tous des taux de prévalence supérieurs à 17% dans la population générale, le Botswana et le Swaziland atteignant une prévalence dépassant 35%. En Afrique de l'ouest, la prévalence du HIV est beaucoup plus faible, aucun pays ne connaît de prévalence supérieure à 10% et la plupart d'entre eux se situent entre 1 et 5%. La prévalence dans les pays d'Afrique centrale et orientale se situe entre ces deux groupes, de 4% à 13%. En Afrique du nord, on estime à 480 000 le nombre de personne vivant avec le HIV, mais la surveillance systématique de l'épidémie n'est pas satisfaisante (293).

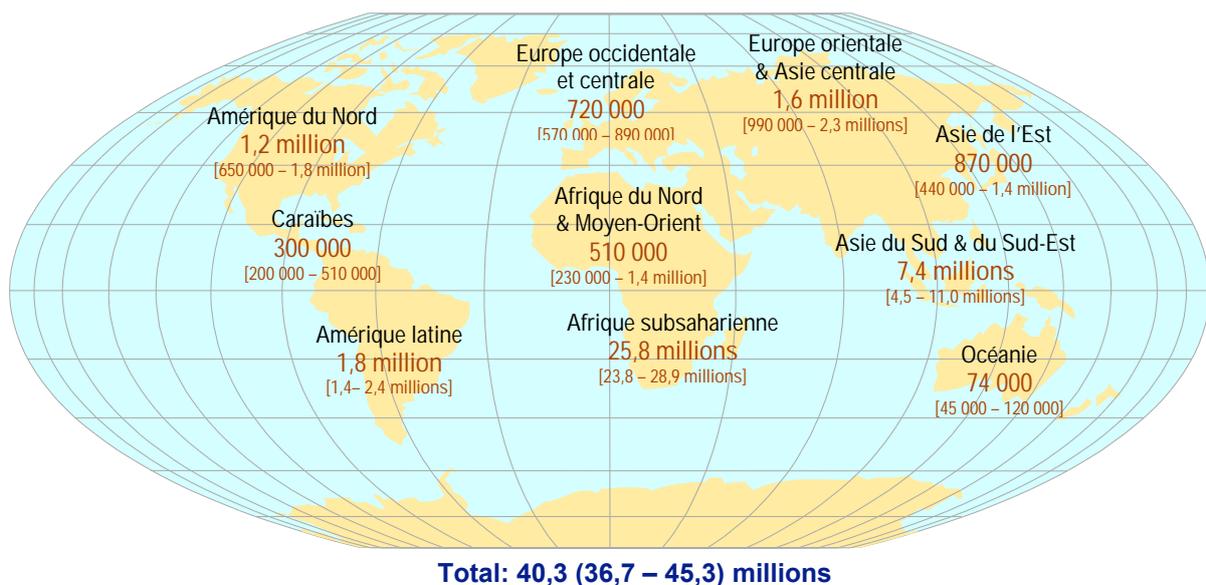


Figure 5. Adultes et enfants vivant avec le HIV, estimations fin 2005 (<http://www.unaids.org/>).

Dans les autres régions du monde, on distingue plusieurs situations. Certaines zones sont caractérisées par une récente augmentation du taux d'infection, c'est le cas de l'Asie (Chine, Indonésie et Viet Nam) et de l'Europe orientale (Russie). L'Amérique latine et les Caraïbes sont caractérisées par des prévalences faibles, mais avec des groupes de populations chez lesquels la prévalence dépasse 60% (les consommateurs de drogues injectables). L'Europe occidentale et les Etats-Unis ont une prévalence faible, mais le rapport de l'ONUSIDA révèle une légère hausse des nouveaux cas d'infection dans ces régions depuis 2001 (293).

Deux types de virus sont responsables de la pandémie de SIDA, le HIV-1 et le HIV-2, et sont principalement caractérisés par des différences en terme de distribution et de propagation à l'échelle mondiale. La majeure partie des infections à travers le monde est causée par le HIV-1 qui est le plus prévalent et le plus couramment retrouvé dans toutes les régions du monde. Le HIV-2 est endémique en Afrique de l'ouest où la presque totalité des cas est décrite (37, 76, 104, 144, 314, 438). Cependant, des cas d'infections à HIV-2 sont décrits hors de cette région de l'Afrique, particulièrement au Portugal et en Inde (202, 215, 338, 370). De rares cas sont aussi décrits en Europe occidentale, en Corée et aux Philippines (102, 224, 243).

B. DIAGNOSTIC DE L'INFECTION A HIV

1. Objectifs du dépistage HIV

La recherche des marqueurs de l'infection à HIV sert essentiellement 3 objectifs :

– *Le diagnostic de l'infection à HIV* qui est un dépistage de l'infection chez des personnes asymptomatiques ou présentant des signes cliniques ou des symptômes évocateurs de l'infection à HIV ou du SIDA.

– *La sécurité des transfusions et des transplantations* qui permet d'assurer l'absence de virus HIV dans le sang et les produits sanguins, les tissus et les organes, ainsi que sperme et ovules destinés à l'usage médical.

– *La surveillance*, c'est-à-dire un dépistage anonyme et non-corrélé sur le sérum, dans un but de surveillance de la prévalence et des tendances de l'infection à HIV au cours du temps, dans une population donnée.

2. Les marqueurs de l'infection

Le diagnostic de primo-infection à HIV repose essentiellement sur la détection des marqueurs virologiques. En effet, aucun signe clinique, seul ou même en associé, n'est suffisamment sensible et/ou spécifique pour affirmer le diagnostic de primo-infection à HIV (101). Trois types de marqueurs peuvent être recherchés pour le diagnostic de l'infection à HIV, et sont par ordre chronologique d'apparition (174):

☞ Marqueurs moléculaires

– *Recherche de l'ARN VIH* : c'est le marqueur le plus précocement détectable, dès les premiers jours après contamination. Il peut atteindre un titre supérieur à 10^6 copies/ml pour décroître rapidement et arriver à un plateau d'équilibre 4 ou 6 mois plus tard (90, 262).

☞ Marqueurs sérologiques

– *Recherche de l'antigène p24* : il est détectable environ 15 jours après la contamination et persiste une à deux semaines avant de se négativer. Ce marqueur est particulièrement utilisé pour le diagnostic de l'infection chez l'enfant de moins de 18 mois né de mère séropositive, les anticorps anti-HIV n'étant pas spécifiques de l'infection chez ces sujets, car pouvant provenir de la mère.

– *Recherche des anticorps anti-HIV* : ils sont détectables par les tests immunoenzymatiques de type ELISA en moyenne trois à quatre semaines après le contage (174). Les premiers à apparaître sont ceux dirigés contre les protéines de l'enveloppe (gp160, gp120 et gp41) et contre l'antigène p24. Il est possible de réduire cette période pendant

laquelle les anticorps anti-HIV sont indétectables (fenêtre sérologique) de une ou deux semaines avec les tests dits de 4^{ème} génération qui détectent simultanément anticorps anti-HIV et antigènes p24 (159, 349, 424).

Outre la cinétique d'apparition de différents marqueurs, il faut prendre en compte lors du choix d'un test de dépistage la faisabilité du test en fonction de l'environnement, des infrastructures et du personnel (difficile de privilégier la recherche d'ARN et l'antigène p24 dans les pays du sud), les performances du diagnostic, par rapport à la diversité génétique locale par exemple, et les coûts (107). Pour ces raisons, le diagnostic sérologique indirect, c'est-à-dire la détection d'anticorps anti-HIV reste la base du diagnostic de l'infection à HIV et repose essentiellement sur les tests de dépistage et de confirmation.

3. Le diagnostic sérologique

Il repose sur la détection des anticorps sériques. Les méthodes immunoenzymatiques de type ELISA sont actuellement les méthodes de référence pour mettre en évidence les anticorps sériques du sujet infecté. L'ELISA nécessite juste quelques heures, permet de tester un grand nombre d'échantillons, est automatisable et a un coût assez accessible dans les pays à revenus limités. Les antigènes utilisés pour ces tests étaient initialement des lysats de cellules infectées par le HIV, mais actuellement la plupart des tests utilisent des protéines recombinantes ou des peptides synthétiques. Les antigènes utilisés doivent le plus possible représenter la diversité génétique et permettre la détection des souches HIV-1 groupe O et HIV-2 (284). Les tests dits de troisième génération, qui remplissaient plus ou moins ces conditions, révélaient la présence d'anticorps environ trois semaines après la date présumée du contagion (174). Depuis 1997, une nouvelle catégorie de tests dits de quatrième génération a été développée et intègre en plus des antigènes courants, l'anticorps anti-p24, permettant ainsi la détection des antigènes p24 qui apparaissent dans les premiers jours suivant l'infection. L'utilisation de ces tests combinés antigène-anticorps permet de réduire de quelques jours la fenêtre sérologique (3, 159, 424). En plus de l'ELISA, une autre catégorie de tests dits rapides, fournissant une réponse en quelques minutes ou quelques heures est aussi disponible. Ils font appel à une agglutination ou à une absorption du complexe antigène-anticorps sur une membrane, suivie d'une coloration visible à l'œil nu. S'ils sont assez performants pour dépister les anticorps anti-HIV-1 et 2, voire même différencier les deux types d'infection (89), ils n'offrent cependant pas le même niveau de sensibilité que les tests de quatrième génération au cours de la primo-infection. Néanmoins, ils ont l'avantage de nécessiter peu ou presque pas d'appareillage, sont souvent très rapides (quelques minutes), certains se conservent assez

bien et longtemps à température ambiante, offrant ainsi une excellente alternative pour les pays à ressources limitées (3, 9, 211, 402). En dépit des progrès réalisés, les tests de dépistage comportent toujours un risque de résultats faussement positifs car la nécessité d'identifier tous les positifs lors du dépistage entraîne l'utilisation de tests de plus en plus sensibles, d'où le recours à des tests de confirmation (72).

4. Les tests de confirmation

Les techniques de référence pour test de confirmation sont le western blot, le LIA (line immunoassay) et équivalent.

Le western blot combine le pouvoir de séparation des antigènes par électrophorèse en milieu dénaturant (exemple de PAGE-SDS) et la capacité de détection de l'ELISA (398). Les protéines dénaturées du HIV-1 et/ou du HIV-2 [*env* (gp160, gp120 et gp41) ; *pol* (p66, p51, p31) ; *gag* (p55, p24, p17)] sont séparées par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire et transférées sur bandelettes de nitrocellulose ou de nylon. La présence d'anticorps contre une protéine donnée est révélée par une réaction immuno-enzymatique qui matérialise la position de la protéine sous la forme d'une bande colorée. Des critères de positivité ont été définis par plusieurs organisations (OMS, CDC ...), mais correspondent en général en la réactivité d'au moins deux des protéines suivantes: gp160/120, gp41, ou p24 (87). Du fait que les antigènes sont produits par lyse des cellules, des protéines cellulaires non éliminées pendant la purification peuvent se fixer aux supports et entraîner des réactions non-spécifiques.

Le LIA est un test de confirmation de seconde génération dont le principe est similaire à celui du western blot, mais qui présente l'avantage de ne pas nécessiter de lysats cellulaires pour la production d'antigènes. En effet, les antigènes utilisés dans ce cas sont des protéines recombinantes et/ou des peptides synthétiques des HIV-1/2 et HIV-1 groupe O (88). Les protéines recombinantes et synthétiques présentent l'avantage de la pureté par rapport au lysat cellulaire du western blot. Ce qui réduit sensiblement les réactions non-spécifiques.

L'identification correcte des personnes infectées par le HIV reste une étape essentielle à l'élaboration de toute stratégie de lutte contre la pandémie. La forte diversité génétique du HIV, particulièrement dans les régions à forte prévalence, l'utilisation du prototype HIV-1 sous-type B pour la mise au point de la quasi-totalité des outils de diagnostic (211, 326), le contexte socio-économique des pays les plus touchés par l'infection rendent difficile, voire impossible l'universalisation d'une stratégie de dépistage. En 1992, l'OMS a publié pour la

première fois des recommandations concernant le choix et l'utilisation des tests de recherche des anticorps anti-HIV (433). A côté de la stratégie de référence qui recommande un test ELISA et un western blot, se sont développées des stratégies alternatives qui permettent de réduire les coûts, nécessitent moins d'infrastructures et sont souvent plus fiables, particulièrement dans les pays en voie de développement. Ces stratégies peuvent associer un, deux, voire trois tests ELISA ou rapides différents et dépendent de l'objectif du dépistage, de la sensibilité et de la spécificité des tests, et de la prévalence du HIV dans la population testée (402, 433).

Stratégie I

Les échantillons sont testés par ELISA ou par une méthode simple/rapide. En cas de réaction positive, le sérum est considéré comme positif pour les anticorps anti-HIV. S'il n'y a pas de réaction, le sérum est considéré comme négatif. Aux fins de la sécurité transfusionnelle, il convient de choisir le test le plus sensible. Si le résultat est positif, le don de sang doit être éliminé selon les mesures de précaution universelles. Pour diagnostiquer et rendre un résultat à un donneur ou à un patient il faudra utiliser les stratégies II ou III

Stratégie II

Tous les échantillons de sérum/plasma sont d'abord soumis à un ELISA ou à un test simple/rapide.

- Un sérum qui ne réagit pas à la première épreuve (test A) est considéré comme négatif.
- Un sérum qui réagit au premier test (test A) est retesté avec un deuxième test (test B) ELISA ou un test simple/rapide, basé sur une préparation antigénique différente et/ou un principe différent (par exemple, méthode indirecte et méthode par compétition).
- Un sérum qui réagit avec les 2 tests A et B est considéré comme positif pour les anticorps anti-HIV.
- Tout sérum qui réagit à la première épreuve (test A positif) mais pas à la deuxième (test B négatif) doit être retesté par ces mêmes trousses. Si les résultats concordent après répétition (les 2 tests A et B sont positifs ou les deux tests A et B sont négatifs) le sérum est considéré soit positif, soit négatif. Si les résultats des 2 épreuves A et B demeurent discordants, le sérum est considéré comme indéterminé.

Stratégie III

Lorsqu'il s'agit de tester des populations où la prévalence du HIV est peu élevée, même en utilisant un test dont la spécificité est élevée, la valeur prédictive positive sera faible. En conséquence, un test supplémentaire s'impose : c'est la stratégie III. Comme avec la stratégie II, tous les sérums sont d'abord testés par ELISA ou un test simple/rapide (test A), et un sérum trouvé positif au premier test est retesté avec un test différent (test B). Un sérum qui ne réagit pas au premier test est considéré comme négatif pour les anticorps anti-HIV. Un sérum qui réagit au premier test mais ne réagit pas au deuxième doit être retesté au moyen de ces 2

réactifs. Cependant, la stratégie III fait appel à un troisième test (test C) si le sérum réagit au deuxième test ou lors de la répétition de la première épreuve. Les 3 tests employés dans cette stratégie doivent être fondés sur des préparations antigéniques différentes et/ou reposer sur des principes différents. Un sérum qui réagit avec les 3 tests est considéré comme positif pour les anticorps anti-HIV. Un sérum dont le résultat demeure discordant à la deuxième épreuve, ou qui réagit au premier et au second test mais ne réagit pas au troisième est considéré comme indéterminé. Un sérum qui réagit au premier test, mais ne réagit ni au deuxième ni au troisième test est considéré comme douteux quand il s'agit de personnes ayant été exposées au risque d'infection par le HIV au cours des 3 derniers mois et négatif quand il s'agit de personnes n'ayant pas été exposées à ce risque.

Diagnostic incertain

Si un cas de séropositivité est diagnostiqué, il faut obligatoirement reprélever un nouvel échantillon de sang chez toutes les personnes séropositives sur le premier prélèvement de sang. Un contrôle est réalisé selon la stratégie indiquée sur ce nouveau prélèvement. Si le résultat est indéterminé, une recherche dans le sérum de personnes symptomatiques présentant des signes correspondant aux critères cliniques de l'OMS, le sérum n'a normalement pas besoin d'être retesté. Pour le diagnostic d'infection à HIV chez les personnes asymptomatiques, ayant un résultat indéterminé au test, un nouveau prélèvement de sang sera effectué au moins 2 semaines après le premier prélèvement et fera l'objet d'un contrôle suivant la stratégie appropriée. Si ce deuxième échantillon donne également des résultats indéterminés, il faut réaliser un Western-Blot HIV-1 voire HIV-2. Si ce dernier résultat est également indéterminé, un suivi peut s'avérer nécessaire (3, 6, 12 mois). Si les résultats demeurent indéterminés après 1 année, la personne est considérée comme séronégative pour le HIV.

Indications des stratégies I, II et III

La stratégie I ne peut être utilisée que pour confirmer le diagnostic clinique chez des personnes dont le cas correspond aux critères cliniques de l'OMS du stade III ou IV de l'infection à HIV, et lorsque la prévalence du HIV dans l'échantillon de population (par exemple des patients tuberculeux dans une salle d'hôpital) dépasse 30%. Pour les populations où la prévalence est moins élevée, on utilisera la stratégie II pour poser un diagnostic chez des personnes présentant les signes cliniques susmentionnés. En ce qui concerne le choix des tests de recherche des anticorps anti-HIV pour les stratégies II et III, le premier test doit avoir la sensibilité la plus élevée, alors que les deuxième et troisième tests auront une spécificité plus élevée que le premier. La stratégie III doit être appliquée pour les patients asymptomatiques dans les groupes de prévalence inférieure à 10%.

C. TRAITEMENT DE L'INFECTION A HIV

D'importants progrès ont été réalisés dans la prise en charge thérapeutique des personnes vivant avec le HIV/SIDA, ce qui a conduit depuis 1986 à la mise sur le marché d'une vingtaine de molécules appartenant à quatre classes définies selon leur mode d'action. De l'introduction des HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) a résulté une amélioration du pronostic vital des patients, grâce à une réduction de la réplication virale et au ralentissement du déficit immunitaire. Néanmoins, ces avancées n'ont pas permis d'éradiquer l'infection chez les patients traités et l'émergence des résistances associée à la persistance des réservoirs viraux latents et la toxicité sur le long terme entraînent une nécessaire mise au point de nouvelles classes thérapeutiques (Figure 7).

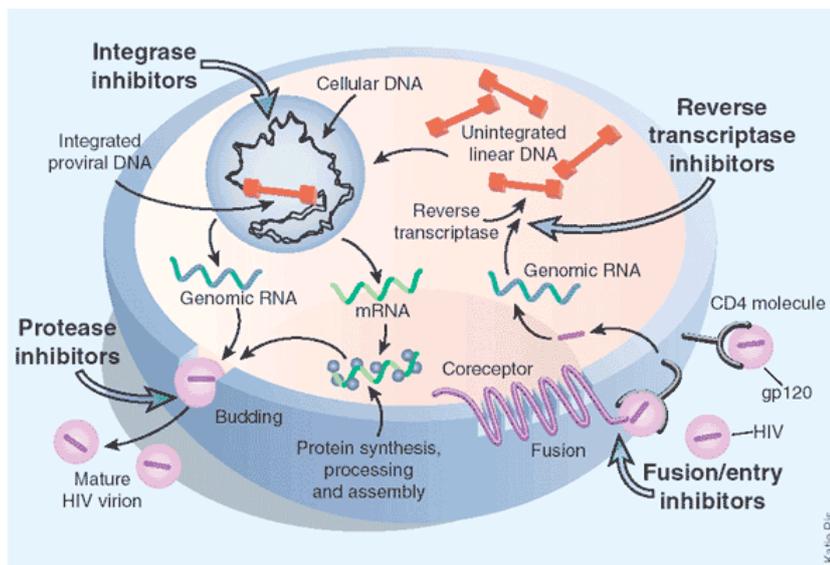


Figure 7. Etapes cibles des inhibiteurs de la réplication du HIV (<http://www.biology.arizona.edu/>).

1. Classes de molécules antirétrovirales

Les antirétroviraux actuellement disponibles agissent au niveau des enzymes nécessaires à la réplication virale du HIV et à l'entrée du virus dans la cellule. Ce sont: (i) les inhibiteurs nucléosidiques de la RT (INRT), (ii) les inhibiteurs non nucléosidiques de la RT (INNRT), (iii) les inhibiteurs de la protéase (IP) et (iv) plus récemment les inhibiteurs d'entrée et de fusion (IF) (109).

☛ Les analogues nucléosidiques de la RT

Ce sont des inhibiteurs nucléosidiques de la RT (INRT) qui constituent la 1^{ère} classe d'antirétroviraux (ARV) mis sur le marché. Leur développement a débuté en 1985 et en 2004 cette classe comptait sept ARVs (204, 277). Ce sont des prodrogues car ils subissent une triphosphorilation intracellulaire conduisant au dérivé actif sur la RT (43). Ils agissent essentiellement par compétition avec les nucléosides naturels.

☛ Les Inhibiteurs non-nucléosidiques de la RT

Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la RT (INNRT) sont structurellement et fonctionnellement différents des INRT. En effet, c'est directement, sans transformation intracellulaire, qu'ils inhibent la RT (373). Ils inhibent cette dernière de façon non compétitive, en se fixant directement sur le site catalytique de l'enzyme. Ce sont de très puissants inhibiteurs de la RT du HIV-1, mais inactifs sur les souches HIV-2 et sur la plupart des souches HIV-1 groupe O, certains isolats de ce groupe présentant une sensibilité génotypique aux INNRT (118, 301, 401).

☛ Les inhibiteurs de la protéase

Les inhibiteurs de la protéase (IP) agissent au niveau du processus d'assemblage des protéines virales nouvellement synthétisées en inhibant l'action d'une enzyme clé à ce processus de maturation virale qu'est la protéase (213). La protéase virale clive les polypeptides précurseurs, produits des gènes *gag* et *pol* codant pour les protéines de structure et les enzymes du virion. Les IP actuellement disponibles sont des peptidomimétiques qui se lient compétitivement sur le site actif de la protéase. Leur action conduit à la production de virions défectifs qui sont incapables d'infecter de nouvelles cellules et sont éliminés. Ils sont actifs sur les HIV-1 et 2 à des concentrations nanomolaires (204). Métabolisés par le cytochrome p450, ils sont l'objet d'interactions avec d'autres médicaments utilisant les mêmes voies métaboliques, ce qui entraîne des contre-indications et des ajustements de doses par rapport à d'autres molécules.

★ Nouvelles approches antirétrovirales

☛ Les inhibiteurs de l'intégrase

Comme la RT ou la protéase, l'intégrase est essentielle à la réplication du HIV (217, 341). En effet, inhiber l'intégration du provirus dans le chromosome cellulaire bloquerait ainsi une étape essentielle de sa pathogénicité. Cette enzyme représente aussi une cible intéressante pour la thérapie antivirale dans la mesure où les cellules cibles ne la codent pas et n'en

requièrent pas (443). Plusieurs molécules conçues dans le but d'inhiber l'intégrase sont en phase d'essai clinique telles que L-731, 988 et S-1360 (56, 127).

✿ *Les inhibiteurs d'attachement et d'entrée*

Le principe de cette nouvelle classe de molécules est complètement différent de celui des précédentes. En effet, ils agissent sur les mécanismes d'entrée et de fusion du virus à la cellule cible afin de bloquer cette étape essentielle à la pathogénicité virale. Ceux déjà développés ou en cours ont pour cibles les différentes étapes d'entrée du virus dans la cellule: fixation sur la molécule CD4, sur les corécepteurs (CCR5 et CXCR4), et fusion entre enveloppe et membrane cellulaire (207). Un seul inhibiteur de fusion, le T20 (Fuzeon) est actuellement commercialisé après autorisation de la FDA. Il empêche la fusion entre les membranes cellulaires et virales en se fixant par compétition au sous domaine HR2 de la gp41 (92, 430, 431) (voir travaux de thèse). Malgré son efficacité prouvée, le T20 présente néanmoins quelques inconvénients que sont les réactions allergiques sur les sites d'injection et le coût très élevé (36, 218, 223). Pour pallier à ces lacunes, d'autres molécules ciblant les différentes étapes de l'entrée du virus sont en cours d'étude et certaines sont déjà en phase d'étude clinique:

- *BMS-488043* : c'est un inhibiteur d'attachement qui se fixe sur les récepteurs CD4+, bloquant ainsi l'attachement des protéines d'enveloppe du virus. Il est actuellement en phase d'étude clinique (162).

- *TNX-355* : c'est un anticorps anti-CD4+ dont le but est de bloquer l'attachement du virus à la cellule sans interférer avec les fonctions biologiques des CD4. Son évaluation dans un essai de phase I a montré une baisse significative de la charge virale couplée à un gain de CD4 (216).

- *PRO 542* : c'est un analogue des récepteurs CD4+, qui entraîne ainsi les particules virales à se fixer sur lui et non sur les cellules. Les premières études cliniques ont montré une bonne efficacité, mais tout comme le T20, il nécessite une administration par injection sous-cutanée (182, 183).

- *SCH D* : c'est une petite molécule qui se fixe sur les co-récepteurs CCR5 et prévient ainsi la fixation des particules virales. Son activité antirétrovirale a été démontrée *in vitro* et *in vivo* sans effets secondaires apparents. Son évaluation clinique est actuellement en cours (354).

D'autres molécules comme *UK-427,857* et *GW-873140* (inhibiteurs du récepteur CCR5) sont en cours d'étude (421), prouvant l'étendue actuelle des champs d'investigation de la recherche dans cette nouvelle classe d'inhibiteurs. En fait, toutes les étapes du processus de

réplication virale présentent un intérêt dans l'élaboration des ARV. L'ultime challenge consiste à définir parmi toutes ces molécules, celles capables d'offrir le meilleur compromis entre efficacité, tolérance et apparition des résistances.

★ **L'immunothérapie**

Le système immunitaire est capable, en l'absence de tout traitement antirétroviral, de réduire de plus de 3 logs la multiplication virale plasmatique lors de la primo-infection et de retarder la progression vers le déficit immunitaire pendant plusieurs années. Le traitement efficace de l'infection à HIV repose sur l'association de plusieurs molécules antirétrovirales. Dans la majorité des cas, ces traitements permettent de réduire la multiplication virale et d'améliorer significativement la qualité de vie et la survie des patients. Malgré ces résultats, ces thérapeutiques ne permettent pas de rétablir un fonctionnement normal du système immunitaire (30). Les objectifs théoriques d'une thérapeutique immunologique peuvent être (i) de préserver les compartiments lymphocytaires TCD4, (ii) maintenir, voire stimuler une réponse immunitaire spécifique du HIV et (iii) restaurer et/ou stimuler une réponse immunitaire vis-à-vis des pathogènes (228). L'immunothérapie pourrait aussi représenter une alternative pour les patients multirésistants. La principale limitation reste l'absence de connaissances des mécanismes précis impliqués dans le contrôle de la réplication virale et au caractère multifactoriel du déficit immunitaire. Néanmoins, des études sur des molécules telles que IL-2, IL-12, l'interféron α (39, 123, 210) ... sont prometteuses et permettent de penser que cette voie thérapeutique a sa place dans le challenge que représente le traitement de l'infection à HIV.

III. DIVERSITE GENETIQUE DES LENTIVIRUS DE PRIMATES ET SES CONSEQUENCES

A. LES CAUSES DE LA VARIABILITE GENETIQUE

Les lentivirus des primates sont caractérisés par une importante diversité génétique qui s'illustre par un foisonnement de variants SIV et HIV. Comme tous les virus à ARN les lentivirus des primates sont caractérisés par une grande instabilité génétique. Cette propriété permet à certains d'évoluer rapidement et continuellement et d'échapper ainsi à la reconnaissance par les effecteurs de l'immunité spécifique, anticorps et lymphocytes T. Dans le cas du HIV, cette variabilité génétique a conduit à la genèse d'une multitude de sous-types et s'explique principalement par quatre facteurs que sont : les erreurs des enzymes de transcription, la dynamique de la réplication virale, la recombinaison et les pressions sélectives.

1. Infidélité de la reverse transcriptase

Ne possédant pas d'activité exonucléasique 3'-5', la reverse transcriptase ne peut corriger les erreurs d'incorporation de nucléotides qu'elle commet (331). Des études *in vitro* montrent que la reverse transcriptase a un taux d'erreur d'environ 10^{-4} mutations par site et par cycle, soit une erreur par cycle répliatif en moyenne (190, 317). Preston *et al* ont montré que la reverse transcriptase du HIV-1 introduit des erreurs de substitution de bases dans l'ADN d'un bactériophage phi X174 amber 3 fois plus fréquemment (1/2000 à 1/4000) que les RT des virus AMV (Avian Myeloblastis Virus) (1/9000 à 1/17000) et M-MuL V (Moloney Murine Leukemia Virus) (1/30000) (317). Leurs travaux mettent aussi en évidence des "mismatches" nucléosidiques catalysés par la RT (A :C>A :G>A :A). Il apparaît donc que les erreurs d'incorporation des nucléotides de la RT sont en grande partie responsables de l'hypermutableté du HIV. Néanmoins, certains auteurs estiment que ce taux d'erreur est surévalué et ne reflète pas la réalité *in vivo*. Pour Mansky *et al*, il est de l'ordre de $3,4 \cdot 10^{-5}$ mutations par paire de base et par cycle, ceci pouvant s'expliquer par la présence de protéines codées par les gènes accessoires et des mécanismes de réparation de l'ADN cellulaire, absents des tests *in vitro* (249). L'infidélité de la RT ne peut cependant pas à elle seule expliquer la très forte variabilité génétique des HIV.

2. Dynamique de la réplication virale

Un facteur très important chez le HIV est la dynamique de sa réplication, car on estime entre 10^9 et 10^{10} le nombre de nouveaux virus produits chaque jour par une personne infectée, ce qui entraîne la génération d'une quantité importante de variants par jour (172, 311, 426). Ainsi, se créent au sein d'un même individu des variants légèrement divergents les uns des autres (1 à 5%) aboutissant à la formation de "quasi-espèce". A ces deux facteurs s'ajoute un troisième qu'est la recombinaison.

3. La recombinaison

La reverse transcriptase des rétrovirus a une forte capacité recombino-gène et la présence de deux brin d'ARN chez les lentivirus de primate lui permet de sauter d'un brin à l'autre pendant la transcription (189, 447). Le HIV recombine une à trois fois par cycle viral (451) et la conséquence la plus visible est le nombre de plus en plus important de virus recombinants et formes recombinantes circulantes CRFs (circulating recombinant forms) (302). Ces CRFs sont favorisés par les co et/ou sur-infections particulièrement dans les zones où cocirculent plusieurs sous-types (173, 310). A cela il faut aussi ajouter les recombinants inter-groupes, particulièrement entre les groupes M et O retrouvé à l'ouest de l'Afrique centrale (309, 386). Bien qu'il n'existe pas de sites spécifiques de recombinaison, les analyses des différents recombinants caractérisés ont permis de déterminer la fréquence d'apparition des points de recombinaison au niveau des différents gènes et ont montré une fréquence plus élevée dans le gène *env* (34,6%), suivi par *gag* (24,7%), *pol* (19,7%), gènes accessoires (11,1%), LTR (7,4%) et *nef* (2,5%) (266, 320).

4. La pression sélective

L'environnement des lentivirus et la nécessité de survivre jouent également un important rôle dans l'émergence et la persistance de certains variants. En effet, parmi les millions de virus produits chaque jour, ne subsisteront que ceux ayant conservé à travers les différentes mutations dues ou non à la RT, leur capacité à se répliquer et donc leur propriétés fonctionnelles. Ainsi, seules les mutations n'altérant pas les propriétés fonctionnelles des protéines (mutations silencieuses ou synonymes) sont tolérées : on parle de pression négative. Les gènes devant conserver leurs propriétés fonctionnelles tel que *pol* subissent généralement ce type pression (208). En revanche, les protéines de structure exposées à la pression immunitaire favorisent les pressions positives aboutissant aux substitutions d'acides aminés entraînant des changements de structure de la protéine (substitutions non-synonymes) et

modifiant les épitopes viraux accessibles. Ce qui à pour conséquence l'échappement aux mécanismes de défense de l'hôte. Cette forme de pression est en parti responsable de la grande variabilité du gène de l'enveloppe (214). Le traitement par les antirétroviraux exerce aussi une pression sélective car les variants résistants échappent à l'inhibition et persistent dans l'organisme (166, 410).

2. Les groupes O et N (Outlier & New)

Les virus appartenant à ces deux groupes représentent moins de 1% des infections à HIV dans le monde.

Les isolats du groupe O décrits pour la première fois au début des années 90 (111, 160, 411), sont trouvés presque exclusivement à l'ouest de l'Afrique centrale (Cameroun, Gabon, Guinée Equatoriale ...) où ils représentent entre 1 et 5% des souches HIV circulants (306), (31, 256). Les isolats du groupe O présentent une importante diversité génétique malgré leur très faible prévalence. Cette diversité génétique est comparable à celle des sous-types HIV-1 M, mais la classification des souches HIV-1 groupe O en sous-types reste complexe (337). Yamaguchi et al. de même que Roques et al. ont montré la formation de cinq principaux sous-groupes dans le groupe O sur des séquences *gag*, *pol* et *env* appartenant à plusieurs isolats, mais de nombreuses souches n'obéissent pas à cette classification et se branchent indépendamment, ce qui compromet pour le moment la classification des souches HIV-1 groupe O en sous-types (337, 439).

Le groupe N est le plus récemment identifié et tous les cas ont été décrits uniquement au Cameroun (59, 336, 366). La phylogénie de ce virus varie en fonction de la région du génome considérée, ainsi dans la partie 5' le HIV-1 groupe N est proche du groupe M même s'il reste assez distant, et dans la partie 3' il se groupe avec le SIVcpzptt (SIV identifié chez les chimpanzés de la partie ouest de l'Afrique centrale) (93, 140). Le fait que le HIV-1 groupe N soit en partie plus proche du SIVcpzptt que des autres groupes HIV-1 (M et O) indique que le SIVcpzptt joue un rôle important dans l'origine du HIV-1 (358). (Voir section: *Les lentivirus simiens et l'origine du HIV*).

3. Les formes recombinantes

En plus de leur capacité à accumuler des changements génétiques mineurs, les souches HIV-1 peuvent également se recombiner et générer d'importantes altérations génétiques (25, 334) . Cette recombinaison requiert qu'une cellule soit infectée par deux provirus différents, permettant l'encapsulation d'un ARN provenant de chaque provirus dans un virion hétérozygote. Après infection ultérieure d'une nouvelle cellule, la RT génère un nouvel ADN recombinant entre les deux brins d'ARN (189, 447). Actuellement, plus d'une vingtaine de CRFs a été identifiée de par le monde, et leurs structures génomiques sont régulièrement mises à jours dans la base de données de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/>) (235). Des exemples de structures de CRF sont représentés dans la Figure 9. Le fait qu'un nombre important de virus recombinants soit identifié implique que la co-infection par des souches

HIV-1 divergents est bien plus fréquente que ce admis à l'époque (25, 374) et plusieurs études récentes ont rapporté des cas de super-infections souvent suivies de recombinaison (15, 58, 128). Néanmoins, elle est favorisée dans les zones où co-circulent plusieurs sous-types, particulièrement au centre et à l'ouest de l'Afrique (142, 186, 200, 327). Des cas de double infection HIV-1/HIV-2 ont été rapportés, cependant il n'a été fait état d'aucun cas de recombinaison entre ces deux virus (100, 200, 283). Par contre, des co-infections et des recombinants inter-groupes M et O ont été identifiés, particulièrement au Cameroun où co-circulent les deux groupes de virus (309, 386, 413).

4. Diversité génétique du HIV-2

L'épidémiologie et la phylogénie moléculaire du HIV-2 sont moins bien maîtrisées que celles du HIV-1 (110, 200, 226). Le HIV-2 comprend actuellement huit sous-types allant de A à H, les souches A et B étant prédominantes en Afrique de l'ouest où le HIV-2 est endémique et toutes les autres souches allant de C à H étant décrites chez des individus uniques (76, 104, 144, 314, 438). La diversité génétique entre ces sous-types est comparable à celle de groupes HIV-1 M, N et O, il serait donc plus logique de parler de groupes HIV-2 et non sous-types (104). Le groupe A est endémique sur la côte atlantique de l'Afrique de l'ouest (Sénégal, Guinée-Bissau, Cap-vert...) et le groupe B est prédominant dans les pays du golfe du Bénin, particulièrement en Côte d'Ivoire, au Mali et au Burkina-Faso (200, 226, 314, 325, 351).

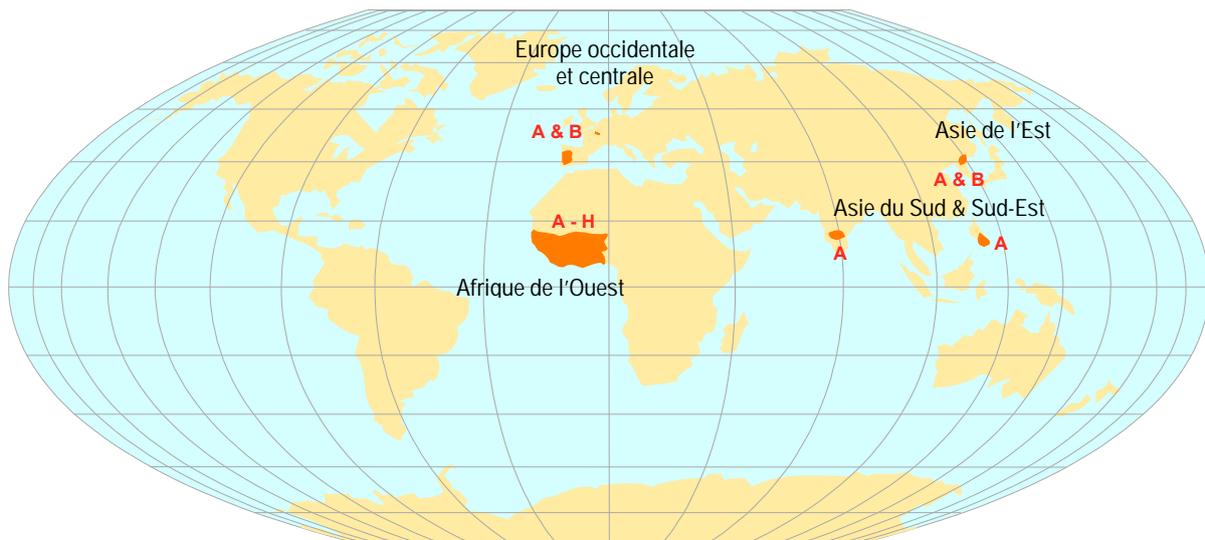


Figure 6. Distribution géographique globale des groupes HIV-2 (réalisée à partir des données des références du paragraphe 4: *Diversité génétique du HIV-2*).

5. Distribution géographique des variants HIV-1

Le génotypage a fourni une meilleure compréhension de l'épidémiologie moléculaire du HIV-1, permettant ainsi la détection des variants émergents et améliorant le suivi de l'épidémie à l'échelle planétaire (25, 259, 302, 310, 374). Les sous-types prédominants dans l'épidémie globale sont les sous-types A et C, suivis du sous-type B, et des recombinants CRF02_AG et CRF01_AE (375, 393). La Figure 10 résume la distribution actuelle des génotypes HIV-1 sur la planète. Elle montre la prédominance du sous-type B aux Etats-Unis, en Europe de l'ouest et en Australie, mais à l'est du continent sud américain on a une importante proportion de recombinants BF en plus du sous-type B. En Europe de l'est co-circulent les souches A, B ainsi que leur recombinants AB. En Asie, le sous-type C est prédominant en Inde, les sous-types B et C et les recombinants BC co-circulent en Chine, et en Thaïlande on retrouve le sous-type B et le CRF01_AE. L'Afrique présente la plus importante diversité génétique avec le sous-type C prédominant au sud et à l'est du continent (1, 2, 286, 327, 407). A l'ouest et au centre-ouest co-circulent majoritairement le CRF02_AG et un complexe mélange de sous-types et formes recombinantes (3, 7, 114, 133, 248, 257, 258, 268, 269, 294, 306, 418, 440). Peu d'informations sur la diversité et la prévalence du HIV sont disponibles en Afrique du nord, au Moyen-Orient et en Asie centrale (293).

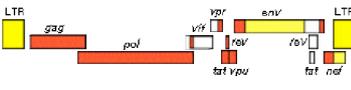
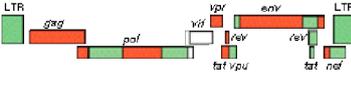
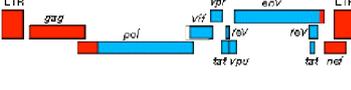
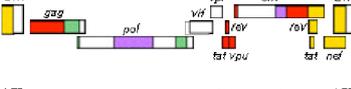
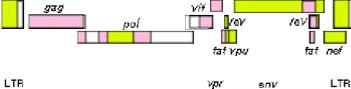
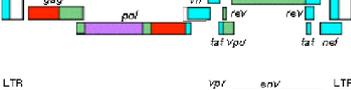
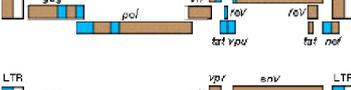
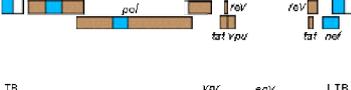
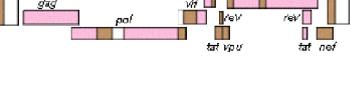
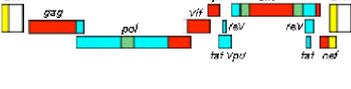
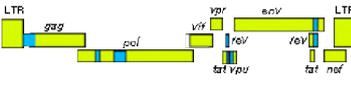
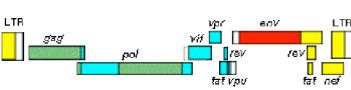
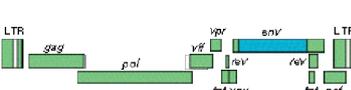
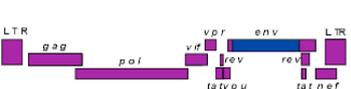
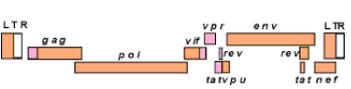
Nom	Séquence	Sous-types	Pays
CRF01_AE		A, E	Asie du Sud-Est, Afrique Centrale
CRF02_AG		A, G	Afrique de l'Ouest
CRF03_AB		A, B	Russie, Ukraine
CRF04_cpx		A, G, H, K, U	Grèce, Chypre
CRF05_DF		D, F	RDC
CRF06_cpx		A, G, J, K	Afrique de l'Ouest
CRF07_BC		B', C	Chine
CRF08_BC		B', C	Chine
CRF10_CD		C, D	Tanzanie
CRF11_cpx		A, CRF01_AE, G, J	Ouest Afrique centrale
CRF12_BF		B, F	Argentine, Uruguay
CRF13_cpx		A, CRF01_AE, G, J, U	Cameroun
CRF14_BG		B, G	Portugal, Espagne
CRF15_01B		CRF01_AE, B	Thaïlande
CRF16_A2D		A2, D	Kenya, Corée du Sud, Argentine

Figure 9. Exemples de structures des génomes mosaïques circulants ou CRFs (*Circulating Recombinant Forms*). Les lettres et les couleurs représentent les différents sous-types qui composent les CRFs (<http://www.hiv.lanl.gov/>. Décembre 2005).

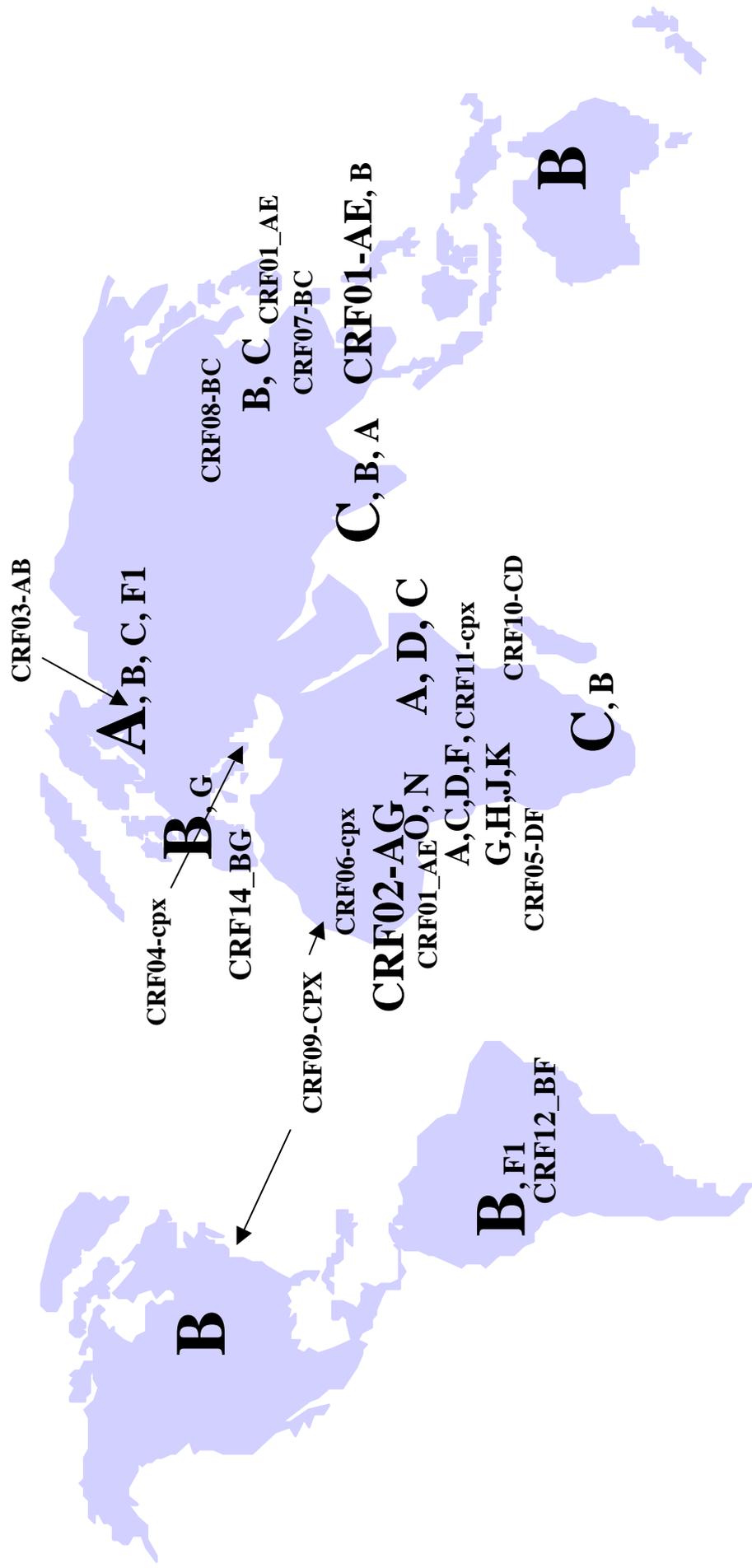


Figure 10. Distribution géographique globale des sous-types et CRF HIV-1. Les formes génétiques prodominantes dans une région sont représentées en caractère plus large.

C. CONSEQUENCES DE LA VARIABILITE GENETIQUE DU HIV

1. Implications sur le diagnostic

Très tôt il a été démontré que des personnes infectées par le HIV-1 groupe O n'étaient pas identifiées par les tests sérologiques à cause de la forte variation de la gp41 de ces virus (238, 350). Ce qui a conduit au développement de tests plus sensibles et plus spécifiques, soit en incluant des antigènes spécifiques au groupe O, soit en utilisant des mélanges antigéniques de HIV à large spectre de croisement (90, 107). De plus, les premiers tests de dépistage développés étaient moins efficaces pour l'identification des patients en début de séroconversion, particulièrement ceux infectés par les souches non-B (23). Il est donc apparu évident que les tests de diagnostic, presque tous quasiment développés sur la base du HIV-1 sous-type B, ne détectaient pas toujours les souches non-B, qui cependant prédominent dans les régions les plus touchées par l'infection. L'addition de l'anticorps p24 dans les tests de quatrième génération a permis d'améliorer la sensibilité des tests de diagnostic et de réduire la fenêtre sérologique (159, 242, 349, 424), mais leur utilisation dans les pays en voie de développement est limitée par la complexité et le coût des techniques de confirmation (3, 423). Il est donc évident que la diversité génétique des HIV peut entraîner des faux négatifs et/ou des faux positifs au dépistage indirect malgré l'utilisation des antigènes consensus extrêmement conservés. Le diagnostic direct n'est pas non plus épargné par cette diversité. En effet, la quantification de la charge virale par les tests de première génération peut être sous-estimée chez les patients infectés par les souches non-B, notamment pour les sous-types A, G, et CRF02_AG (16, 120). Les tests actuellement commercialisés ont été améliorés et permettent de détecter davantage de souches non-B. Très peu sont néanmoins capables de quantifier efficacement le groupe O et aucun ne permet jusqu'à présent de détecter toutes les souches du HIV-1 (113, 381). Cette lacune est fortement marquée par l'absence sur le commerce de test de quantification du HIV-2 (103). Ainsi, pour maintenir une sécurité transfusionnelle et assurer l'identification correcte des personnes infectées par le HIV, il est indispensable d'évaluer et d'adapter les outils de diagnostic à la diversité génétique.

2. Conséquences sur le traitement

Comme c'est le cas pour les outils de diagnostic, la presque totalité des molécules antirétrovirales mises sur le marché sont conçues sur le prototype HIV-1 sous-type B, et très rapidement il s'est avéré que certaines souches HIV non-B étaient moins sensibles à certaines classes de molécules. Ainsi, le HIV-2 et le HIV-1 groupe O sont naturellement résistants aux

INNRT (118, 301, 319, 389, 444). A l'intérieur du groupe M, le sous-type F est moins sensible aux dérivés d'un INNRT qu'est le TIBO (tetrahydroimidazo [4,5,1-*jk*] [1,4]-benzodiazepin-2-[1*H*-one et -thione]) et le sous-type G présente aussi une faible sensibilité à certains IP (ritonavir et saquinavir) (20, 117). A ces résistances naturelles vont s'ajouter les résistances acquises sous traitement et sélectionnées sous pression médicamenteuse. Des études récentes montrent que la vitesse d'apparition de ces résistances peut être influencée par le sous-type viral. En effet, comparé au sous-type A, le sous-type D développerait plus fréquemment une résistance à la névirapine d'après une étude réalisée chez des femmes enceintes sous prophylaxie à dose unique de névirapine (124). Le sous-type C développerait plus rapidement une résistance aux INNRT, lié à un polymorphisme naturel au codon 106 (63, 233). Sous la pression de l'efavirenz et un peu moins sous celle de la névirapine, les sous-types C développent une mutation différente de celle des souches B, la V106M, qui confère un fort taux de résistance croisée aux INNRT (271). La mutation observée chez les souches B étant la V106A. Comparé aux sous-types B, les sous-types C sélectionnent aussi plus rapidement les variants résistants aux INNRT (154). Le sous-type, et donc la variabilité génétique, influence aussi la voie de la résistance. C'est le cas par exemple du sous-type G qui sous nelfinavir développe la mutation L90M associée à des résistances croisées aux IP, alors que la voie classique de résistance à cette molécule développée par le sous-type B est la mutation D30N (151). Il en est de même pour le sous-type C qui sous la pression du nelfinavir sélectionne rarement D30N (6%) par rapport au sous-type B (38%) (155). Il est aussi démontré que les souches non-B sélectionnent sous la pression des IP (Indinavir, Saquinavir et Ritonavir), G48V et V82A/F, plutôt que L90M (69). Enfin, comparés aux B, les sous-types non-B présentent des mutations mineures particulièrement dans la protéase (L10I/V/R, K20R, et M36I) capables d'influencer leur " fitness ", c'est-à-dire leur efficacité replicative par rapport aux virus standards sauvages (315, 414). Ces mutations mineures ont une conséquence indirecte liée à leur interprétation par les algorithmes existants (Stanford, Réga et ANRS). En effet, les discordances d'interprétation de ces mutations par les trois algorithmes ne permettent pas de déterminer leur impact réel sur la sensibilité des molécules antirétrovirales (415).

3. Impact sur la transmission et l'évolution de la maladie

Il a été postulé que la variabilité génétique pourrait induire des différences biologiques capables d'expliquer, du moins partiellement, les différences d'évolution de l'épidémie observées de par et d'autre dans le monde. En effet, d'après plusieurs études, des différences

en terme de charges virales, de corécepteurs utilisés, de niveaux d'activation transcriptionnelle et de sensibilité aux ARV peuvent être observées en fonction du type viral (175, 177, 188, 203, 399, 420). L'infection à HIV-2 comparée à celle du HIV-1 reflète ces différences d'évolution de la maladie. En effet, bien que partageant des propriétés identiques, le HIV-1 et le HIV-2 présentent d'importantes différences *in vivo*, qui se traduisent par une virulence moins importante pour le HIV-2 avec une charge virale plus faible et une période asymptomatique plus importante, ainsi qu'une transmission plus faible (19, 198, 201, 252, 316). Les principaux mécanismes responsables de la pathogénicité réduite du HIV-2 restent majoritairement inconnus, mais sont probablement les résultantes d'une combinaison de facteurs virologiques et immunologiques. Il est possible que l'infection à HIV-2 soit mieux contrôlée par le système immunitaire que celle à HIV-1, car il a été montré que la réponse des anticorps neutralisants autologues était plus importante à l'infection à HIV-2 par rapport au HIV-1 (18, 71). Des différences ont aussi été rapportées dans la réponse des lymphocytes T cytotoxiques, le niveau d'apoptose, la production des β -chémokines et l'habileté des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ à produire les interleukines 2 et 4, ainsi que l'interféron- γ (18, 185, 265, 372).

En fonction du sous-type, bien que les conséquences fonctionnelles exactes ne soient pas encore clairement démontrées, certaines études rapportent néanmoins que des différences peuvent être observées au niveau de la transmission mère-enfant et dans la vitesse de progression de la maladie.

➤ ***Impact sur la transmission périnatale***

Une étude réalisée en Tanzanie suggère que les sous-types A, C et leur recombinant sont plus fréquemment transmis de la mère à l'enfant que le sous-type D (328). Cependant, une autre réalisée en Uganda sur la transmission périnatale n'a pas observé cette différence entre les sous-types A et D, et au contraire celle menée au Kenya montrait plutôt une fréquence plus élevée de transmission périnatale du sous-type D par rapport au A (125, 441). Ces contradictions entre les différentes études montrent qu'il faudra beaucoup d'autres investigations pour déterminer l'impact réel du sous-type sur la transmission périnatale.

➤ ***Impact sur la progression de la maladie***

Au niveau de la progression de la maladie, deux études ont rapporté des différences liées au sous-type. Une étude conduite au Sénégal sur un nombre limité de patients montre que les femmes infectées par les sous-types non-A ont 8 fois plus de chance de développer rapidement un sida que celles infectées par le sous-type A (199). Le suivi d'une cohorte de

plus de 1000 patients en Uganda démontre une rapide progression de la maladie associée à un faible taux de CD4 chez les patients infectés par le sous-type D par rapport à ceux porteur du sous-type A (197). Cependant, aucune différence dans la progression de la maladie n'a été observée chez des patients infectés par les sous-types B et C en Israël (427), parmi des patients infectés par les sous-types A, B, C et D en Suède (10), B et CRF01_AE en Thaïlande (17), ou CRF02_AG et d'autres sous-types au Cameroun et au Sénégal (220).

4. Les chances d'un vaccin

La grande diversité génétique du HIV et son extraordinaire capacité à échapper aux pressions sélectives à travers la variation génétique sont parmi les obstacles majeurs à la mise au point d'un vaccin efficace contre ce pathogène (126, 378, 393). Cet obstacle est clairement illustré par les essais vaccinaux chez les primates non-humains, chez lesquels l'administration d'un vaccin atténué anti-SIV, qui pourtant confère une très forte protection contre le lentivirus du primate, est cependant inefficace face à une superinfection avec un SIV qui n'est pas naturellement porté par le primate (435). Vu la diversité des souches HIV circulantes, cette observation attire l'attention sur la difficulté d'obtenir un vaccin à large spectre de protection contre les différentes souches (393). Pour ces raisons, des institutions telles que l'OMS et l'ONUSIDA suggèrent que les candidats vaccins soient choisis en fonction de la diversité génétique régionale, c'est à dire qu'un vaccin destiné à l'Afrique australe doit être prioritairement efficace contre les souches HIV-1 sous-type C par exemple. Cependant, cette stratégie est limitée par l'incapacité de prédire l'évolution génétique du HIV dans le futur vu sa forte cinétique d'évolution (403). Ainsi, pour minimiser l'impact de la diversité génétique, d'autres études proposent plutôt des vaccins basés sur les souches ancestrales ou consensus dans des régions ayant un sous-type prédominant et des mélanges vaccinaux incluant chaque sous-type prévalent dans les régions où co-circulent plusieurs sous-types (141, 274, 378, 403). A ces difficultés liées à la variabilité des HIV, il faut ajouter le manque de connaissances actuelles de tous les mécanismes impliqués dans la transmission et la pathogénicité du HIV, ainsi que les facteurs virologiques et immunologiques impliqués. Ce qui ne permet pas de déterminer avec précision les voies et moyens nécessaires à la conception d'un vaccin préventif efficace.

Malgré toutes ces incertitudes scientifiques, un grand nombre de candidats vaccins a été développé à ce jour et testé sur des modèles animaux. Les plus prometteurs font ensuite l'objet d'études cliniques chez l'homme (phase I, II et III). Le premier essai de phase I d'un candidat vaccin a été conduit en 1987 aux Etats-Unis et depuis, près de 10 000 volontaires

séronégatifs ont participé à pas moins de 70 essais différents en phase I/II incluant une trentaine de candidats vaccins à travers le monde. Différentes approches ont été développées au cours des vingt dernières années pour concevoir ces candidats vaccins, avec à chaque fois l'initiation de nouveaux concepts.

La première vague de candidats vaccins était basée sur le concept que les anticorps seraient suffisants pour conférer une protection contre l'infection à HIV. Ce concept ayant fonctionné pendant plusieurs décennies pour d'autres vaccins efficaces. Dans ce contexte, plusieurs candidats vaccins basés sur les protéines d'enveloppe HIV-1 (gp120 ou gp160), ou sur des peptides synthétiques de la boucle V3 ont été testés chez l'homme (49, 60, 260).

La seconde vague de candidats vaccins a été initiée par la reconnaissance de l'importance de la réponse des cellules T CD8⁺ dans le contrôle de l'infection à HIV (261). Ce paradigme a conduit au développement de virus recombinants vivants (vecteurs vivants) capables de délivrer des antigènes HIV-1 de classe I (HLA) et aussi d'exprimer des antigènes de différents sous-types HIV-1 (47). Des études menées sur les vecteurs ALVAC-HIV ont montré l'absence de danger pour les patients et leur capacité à induire une réponse CTL détectable, voire croisée contre différents sous-types HIV, fournissant ainsi des voies de développement de vaccins à large spectre de protection (68, 131). Cependant, le faible pourcentage de patients exprimant une réponse CTL détectable (20 à 40%) reste une limitation pour ces candidats (158).

La troisième vague de candidats vaccins est un peu la combinaison de toutes les connaissances actuelles, avec pour objectifs de développer des candidats vaccins capables (i) d'induire des anticorps neutralisant les souches R5 et X4 de tous les sous-types HIV et/ou (ii) d'induire de fortes réponses CTL persistantes et croisées pour différents sous-types. Cette nouvelle ère a vu l'entrée en liste des vaccins ADN (généralement en combinaison avec un virus vecteur) et des vaccins lipopeptidiques (276, 313). Un de ces nouveaux candidats vaccins est représenté par un vecteur Adénovirus type 5 incapable de se répliquer développé par Merck, qui dans une combinaison ADN-primovaccin/Adénovirus-rappel induit une forte réponse CTL chez le macaque/SHIV et chez l'homme (365). D'autres voies d'étude incluant des vecteurs viraux et bactériens sont en cours d'exploration, de même que des candidats vaccins incluant des gènes de régulation. Des études visant à développer des combinaisons primovaccin/rappel plus efficaces, l'utilisation de nouveaux adjuvants type cytokines (IL-2, IL-12, IL-15 ...) et le développement de nouveaux systèmes d'administrations sont également en cours (126).

IV. LES LENTIVIRUS SIMIENS ET L'ORIGINE DU HIV

Plus de 30 variants de virus de l'immunodéficience simienne (SIV) ont à ce jour été décrits chez des petits et grands singes d'Afrique. Ils sont naturellement portés par ces primates et plusieurs évidences prouvent que le passage de deux de ces virus à l'homme est à l'origine du HIV. Il est en effet démontré que le SIVcpz du chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) et le SIVsmm du mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) sont les précurseurs respectifs du HIV-1 et du HIV-2 chez l'homme. Cette origine simienne du HIV est le résultat de transmissions inter-espèces du SIVcpz et du SIVsmm du singe à l'homme. Bien que portant la dénomination SIV, par analogie à HIV, les lentivirus des primates non-humains sont généralement reconnus non pathogènes pour leurs hôtes naturels. Ils sont généralement désignés par une abréviation comportant le sigle SIV suivi des trois premières lettres ou du diminutif du nom de l'espèce de primate (SIVagm pour SIV isolé du singe vert d'Afrique ou *African green monkey*). La grande diversité des SIV chez les primates africains, souvent associée à une forte prévalence, soulève des interrogations sur d'éventuelles transmissions d'autres variants SIV du singe à l'homme. De plus, des études *in vitro* montrent que d'autres SIV en dehors du SIVcpz et du SIVsmm, ont la capacité d'infecter et de se répliquer dans les PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) et cellules de la lignée T humains, ce qui suggère qu'ils pourraient être transmis à l'homme avec succès. D'où la nécessité de vérifier si de nouvelles transmissions de SIV du singe à l'homme sont possibles, et si oui, résulteraient-elles à l'émergence de nouveaux HIV. Cette question est fondamentale dans la mesure où elle permettrait d'évaluer les risques réels d'émergence d'une nouvelle zoonose.

A. ORIGINE DU HIV

1. Du SIVcpz au HIV-1

Le chimpanzé (*Pan troglodytes*) est l'hôte naturel du SIVcpz (305, 307). Sur la base de l'ADN mitochondrial, on distingue quatre sous-espèces différentes de chimpanzés occupant des territoires naturels distincts (139). La sous-espèce *Pan troglodytes verus* se retrouve en Afrique de l'ouest, *Pan troglodytes troglodytes* est présente à l'ouest de



Photo 1. Chimpanzé (*Pan troglodytes*). Réalisée par les chercheurs de l'UMR-145 IRD.

l'Afrique centrale, *Pan troglodytes schweinfurthii* vit en Afrique de l'est et la dernière sous-espèce *Pan troglodytes vellerosus* vit sur une portion géographique limitée par les rivières Cross-River au Nigeria et la Sanaga au Cameroun (152, 157, 270) (Figure 11).

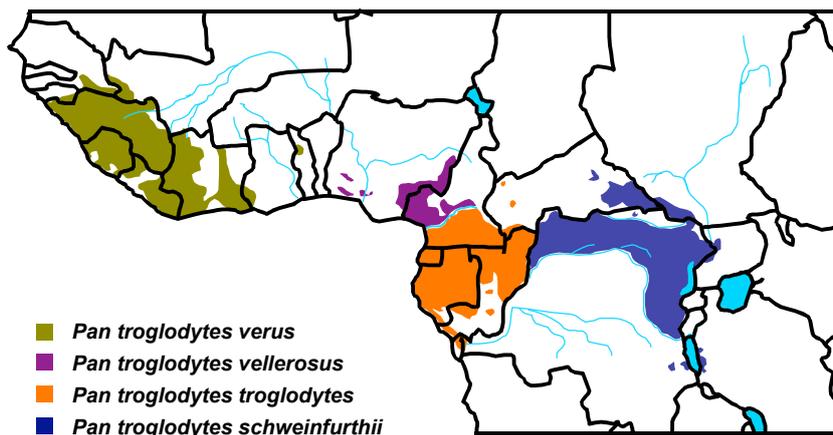


Figure 11. Distribution géographique des différentes espèces de chimpanzés en Afrique. Adaptée de (Santiago, ML et al. 2003).

A ce jour, seules les sous-espèces *Pan troglodytes troglodytes* et *Pan troglodytes schweinfurthii* ont été identifiées comme hôtes naturels du SIVcpz. Sur un arbre phylogénétique, HIV-1 et SIVcpz se regroupent ensemble (Figure 12A). Cependant, les SIV des deux espèces de chimpanzé n'ont pas la même proximité phylogénétique avec le HIV-1. En effet, seul le SIVcpz du *Pan troglodytes troglodytes* est étroitement proche des souches HIV-1 groupe M, N et O (343, 347) (Figure 12A). Ce qui signifie que le HIV-1 est le résultat d'une transmission zoonotique du SIVcpz du *P. t. troglodytes* du chimpanzé à l'homme (140, 358). L'espèce *P. t. troglodytes* étant essentiellement retrouvé à l'ouest de l'Afrique centrale, il est donc très probable que cette région soit le foyer d'origine du HIV-1 (358). Les analyses phylogénétiques du SIVcpz et des souches HIV-1 groupe N provenant du Cameroun ont montré que dans les régions *env* et *nef* les deux virus forment un groupe monophylétique (140, 366). D'où l'hypothèse selon laquelle les HIV-1 groupe M, N et O sont les résultantes de trois évènements distincts de transmission inter-espèces du SIVcpz du chimpanzé à l'homme (358). Une récente étude montre clairement que le SIVcpz du *P. troglodytes schweinfurthii* de l'Afrique de l'est n'est pas aussi proche du HIV-1 que le SIVcpz du *P. t. troglodytes* présent à l'ouest de l'Afrique centrale et réfute la théorie de l'origine vaccinale du HIV-1 à travers les campagnes de vaccination anti-poliomyélite réalisées en Afrique de l'est à la fin des années 50 (434).

Bien qu'ayant été tous les trois transmis avec succès au genre humain, les différents groupes du HIV-1 (M, N et O) présentent des profils épidémiologiques très différents. En effet, des trois groupes HIV-1, le groupe M à lui tout seul représente actuellement plus de 99% des cas d'infection à HIV-1 dans la population mondiale. Les HIV-1 groupe N et O restent restreints à l'ouest de l'Afrique centrale et principalement au Cameroun, avec de très faibles prévalences, moins de 1% pour le groupe O et moins d'une dizaine de cas décrits pour le groupe N (31, 59, 256, 306, 336, 366).

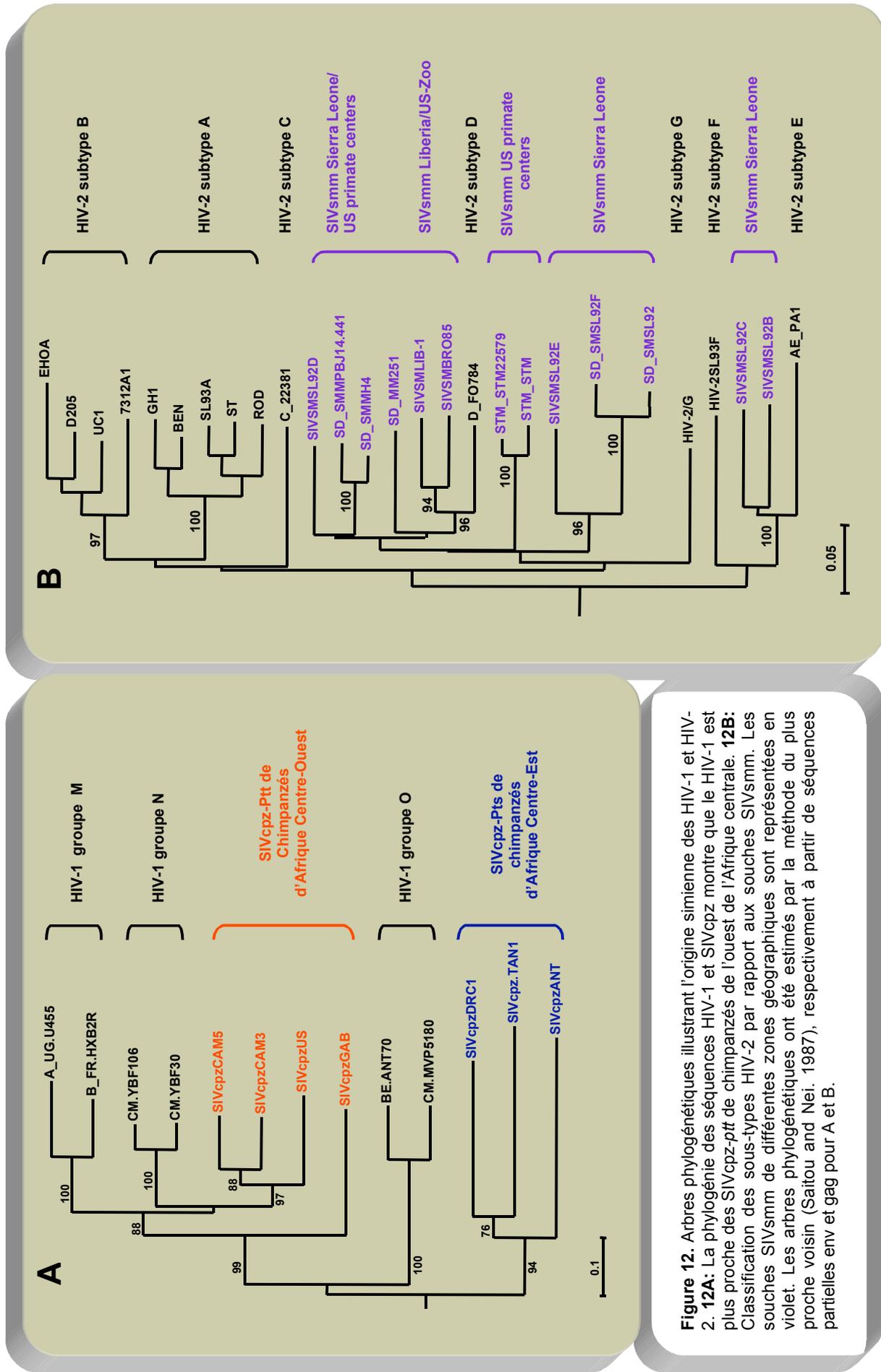


Figure 12. Arbres phylogénétiques illustrant l'origine simienne des HIV-1 et HIV-2. **12A:** La phylogénie des séquences HIV-1 et SIVcpz montre que le HIV-1 est plus proche des SIVcpz-ptt de chimpanzés de l'ouest de l'Afrique centrale. **12B:** Classification des sous-types HIV-2 par rapport aux souches SIVsmm. Les souches SIVsmm de différentes zones géographiques sont représentées en violet. Les arbres phylogénétiques ont été estimés par la méthode du plus proche voisin (Saitou and Nei, 1987), respectivement à partir de séquences partielles env et gag pour A et B.

2. Du SIVsm au HIV-2

Comme observé entre le SIVcpz et le HIV-1, l'étroite ressemblance phylogénétique entre le SIVsmm du mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) et le HIV-2 montre que le premier est à l'origine du second (Figure 12B). En effet, le HIV-2 est le résultat d'une transmission zoonotique du SIVsmm du mangabey enfumé à l'homme en Afrique de l'ouest, où coïncident habitat naturel du mangabey enfumé et foyer endémique du HIV-2 (144, 171, 226). De plus, les contacts directs entre les populations locales et le mangabey enfumé sont courants dans la région, où ce singe est chassé pour sa viande et aussi utilisé comme animal de compagnie (253).



Photo 2. mangabey enfumé (*Cercocebus atys*).
<http://www.psych.upenn.edu/>.

Le mangabey enfumé est un petit primate qui vit dans les forêts primaires et secondaires de la côte ouest africaine couvrant le territoire délimité par la rivière Casamance au Sénégal et le système Sassandra/Nzo en Côte d'Ivoire (157, 209, 321) (Figure 13). Ce primate est menacé d'extinction au Sénégal, en Guinée Bissau et dans certaines régions de la Guinée à cause de la chasse intensive et des populations assez denses ne sont plus observables qu'en Sierra Léone, au Libéria et à l'ouest de la Côte d'Ivoire (26, 77). L'infection à SIVsmm a été documentée chez des mangabeys enfumés en captivité (22, 137, 171, 232, 308), chez des animaux sauvages (77), sur de la viande de brousse de mangabey enfumé (26) et chez des mangabeys enfumés de compagnie (77, 253). La prévalence de l'infection à SIVsmm chez le mangabey est assez élevée, excédant 50% chez les animaux adultes (26, 137). Diverses séquences de HIV-2 ont été décrites dans les régions où le mangabey enfumé est naturellement rencontré.

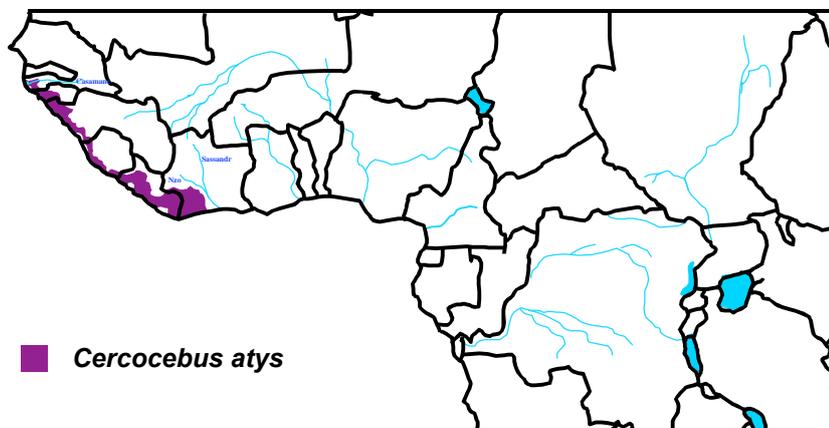


Figure 13. Distribution géographique des populations de mangabeys enfumés en Afrique de l'Ouest (Kingdom, 1997).

Huit groupes de HIV-2 ont été décrits allant de A à H. La majorité des souches HIV-2 circulantes appartiennent aux groupes A et B qui prédominent respectivement dans la partie ouest de l'Afrique de l'ouest (Guinée-Bissau, Sénégal) et en Côte d'Ivoire (144, 314). Les groupes C à H sont représentés par des séquences uniques identifiées chez quelques individus (62, 76, 104, 144, 438). La souche G (Abt96) a été identifiée chez un donneur de sang Ivoirien (62), la souche H chez un patient originaire de la Côte d'Ivoire (104) et les souches C, D, E et F ont été décrites en zone rurale de Sierra Léone et du Libéria et ont la particularité d'être génétiquement plus proches des souches SIVsmm circulant dans les mêmes régions que d'autres HIV-2 (76, 77). Par conséquent, tel que le montre la Figure 12B, la distribution des souches HIV-2 et SIVsmm dans cette lignée est assez parsemée, suggérant que le HIV-2 est le résultat de plusieurs événements de transmission indépendants du SIVsmm dans la population humaine (76, 161). En effet, les groupes E et F du HIV-2 sont phylogénétiquement très proches des souches SIVsmm de la Sierra Léone et le groupe HIV-2 D est très proche de la souche SIVsmm libérienne SIVsmmLIB1. Dans une récente étude réalisée en Côte d'Ivoire sur les colonies de mangabeys enfumés de la forêt de Taï, Santiago et al ont montré que les groupes A et B du HIV-2 étaient les résultats d'événements indépendants de transmission du SIVsmm du mangabey enfumé à l'homme, et que la partie est de l'Afrique de l'ouest était le point d'origine des groupes HIV-2 A, B, C, G et H (346).

B. DIVERSITE GENETIQUE ET EVOLUTION DES SIV

Les primates africains sont les hôtes naturels du virus de l'immunodéficience simienne. A l'exception du SIVcpz isolé du chimpanzé, tous les SIV identifiés proviennent de primates appartenant à la famille des *Cercopithecidae* ou singes de l'ancien monde (Tableau 2) (6, 24). Les SIV isolés de ces primates sont généralement désignés par une abréviation comportant le sigle SIV suivi des trois premières lettres ou du diminutif du nom de l'espèce de primate (SIVagm pour SIV isolé du singe vert d'Afrique ou *African green monkey*).

1. Grands singes et infection à SIV

La famille des *Hominidae* comprend quatre grands singes qui sont le chimpanzé, le gorille, le bonobo et l'orang-outan. L'orang-outan appartient à la sous-famille des *Ponginae* et le chimpanzé, le bonobo et le gorille à la sous-famille des *Homininae* (157). Seuls les chimpanzés de l'espèce *Pan troglodytes*, et particulièrement ceux des sous-espèces *Pan t. troglodytes* et *P. t. schweinfurthii* sont naturellement porteurs d'un SIV: le SIVcpz. Aucune évidence d'existence d'un lentivirus naturel n'a été rapportée chez les chimpanzés des sous-espèces *P. t. verus* et *P. t. vellerosus*, chez le bonobo et chez le gorille (318, 367, 406). Il est intéressant de constater que les quatre sous-espèces *P. t. troglodytes*, *P. t. schweinfurthii*, *P. t. verus* et *P. t. vellerosus* ont des habitats naturels distincts allant du sud-ouest de l'Afrique au bassin du Congo (Figure 11). Donc, si seules les sous-espèces *P. t. troglodytes* et *P. t. schweinfurthii* sont porteurs du SIVcpz, ceci prouve que l'acquisition du SIV par le chimpanzé est récente, du moins qu'elle s'est produite après la séparation géographique de ces sous-espèces et leur différenciation il y a 300 000 à 900 000 ans (383). Ainsi, seul l'ancêtre commun du *P. t. troglodytes* et du *P. t. schweinfurthii* aurait été infecté par le SIVcpz, avant la séparation de ces deux sous-espèces (il y a environ 117 000 ans) qui en se différenciant à leur tour dans leur zone géographique respective, ont engendré le SIVcpzptt et le SIVcpzpts. Récemment, l'identification de nouveaux lentivirus dans le genre *Cercopithecus* a permis de démontrer qu'en fait le SIVcpz est un virus recombinant, probablement un recombinant entre le précurseur du SIVrcm du cercocèbe à collier blanc (*Cercocebus torquatus*) dans la région 5' et le précurseur des virus de la lignée SIVgsn/mus/mon (détails dans le prochain paragraphe) dans la région 3' (Figure 14) (35, 98, 361). Cette découverte étant confortée par le fait que le gène *vpu* qui jusqu'alors était exclusivement retrouvé chez les virus de la lignée HIV-1/SIVcpz, est présent chez les virus de la lignée "gsn/mus/mon" (95, 98). Il est donc logique de penser que les virus de la lignée HIV-1/SIVcpz sont porteurs

Tableau 2. Infections naturelles à SIV chez les grands (*Hominidae*) et petits (*Cercopithecoidea*) singes d'Afrique.

Famille	Sous-famille	Tribu	Genre	Superespèces	Espèces	Nom commun	SIV	Distribution géographique	Références
<i>Hominidae</i>	<i>Homininae</i>		<i>Pan</i>		<i>troglodytes</i>	chimpanzé commun	SIVcpz	Du Sénégal à la Tanzanie	93, 140, 180, 343, 347, 412
<i>Cercopithecoidea</i>	<i>Colobinae</i>		<i>Colobus</i>		<i>guereza</i>	colobe guéréza	SIVcol	Nigeria-Ethiopie/Tanzanie	97, 304
			<i>Procolobus</i>		<i>badius</i>	colobe bai d'Afrique occidentale	SIVwrc*	Sénégal-Ghana	96
					<i>verus</i>	colobe de Van Beneden	SIVolc*	Sierra Léone-Ghana	96
	<i>Cercopithecinae</i>	<i>Papionini</i>	<i>Cercocebus</i>		<i>atys</i>	mangabey enflumé	SIVsmm	Sénégal-Ghana	77, 171, 232, 253, 308
					<i>torquatus</i>	cercocebe à collier blanc	SIVrcm	Nigeria-Cameroun-Gabon	46, 149
					<i>agilis</i>	cercocebe agile	SIVagi*	Nord-est Gabon-Nord-est Congo	280
			<i>Mandrillus</i>		<i>sphinx</i>	mandrill	SIVmnd1/2	Cameroun (sud Sanaga)-Gabon-Congo	178, 304, 384, 400
					<i>leucophaeus</i>	drill	SIVdrl	Sud-est Nigeria-Cameroun (nord Sanaga)	83, 178
			<i>Papio</i>		<i>cynocephalus</i>	babouin cynocéphale	SIVagm-Ver*	Angola-Tanzanie	192, 212
					<i>ursinus</i>	Le Chacma	SIVagm-Ver*	Sud Angola-Zambie	409
					<i>anubis</i>	babouin de Guinée	?	Mali-Ethiopie	304
			<i>Lophocebus</i>		<i>aterrimus</i>	mangabey noir	SIVbkm	RDC	387
					<i>albigena</i>	Mangabey à joues grises	?	Nigeria-Ouganda/Burundi	304
<i>Cercopithecoidea</i>			<i>Cercopithecus</i>	<i>mitis</i>	<i>nictitans</i>	singe hocheur	SIVgsn	Forêts d'Afrique de l'Ouest-Congo/RDC	98, 304
					<i>mitis</i>	singe bleu	SIVblu	Est Congo-vallée du rift	52
					<i>albigularis</i>	cercoptithèque à diadème	SIVsyk	Somalie-Est du Cap	50, 121, 122, 169
				<i>cephus</i>	<i>cephus</i>	moustac	SIVmus	Cameroun (sud Sanaga)-RDC (est-Congo)	95, 304
					<i>ascanius</i>	l'ascagne	SIVasc*	Sud-Est Congo-Ouest Tanzanie	416
					<i>erythrotis</i>	moustac à oreilles rousses	SIVery*	Nigeria-Cameroun-île de Bioko	324
				<i>mona</i>	<i>mona</i>	cercoptithèque mona	SIVmon	Delta du Niger-Cameroun (nord sanaga)	40, 95, 304
					<i>denti</i>	Singe mona de Dent	SIVden	RDC	108
					<i>pogonias</i>	mona couronnée	?	Nigeria (Cross river)-Est Congo	304
					<i>campbelli</i>	singe des palétuviers	?	Gambie-Côte d'Ivoire	45
			<i>diana</i>		<i>diana</i>	cercoptithèque diane	?	Sierra Léone-Côte d'Ivoire	240
			<i>neglectus</i>		<i>neglectus</i>	singe de brazza	SIVdeb	Angola/Cameroun/Gabon-Ouganda, Ouest Kenya	50, 240, 304
				<i>lhoesti</i>	<i>lhoesti</i>	cercoptithèque de l'Hoeest	SIVlho	Est Congo-RDC-Ouest Ouganda	44, 167, 344
					<i>solatus</i>	cercoptithèque à queue de soleil	SIVsun	Sud Gabon	45
				<i>hamlyni</i>	<i>hamlyni</i>	cercoptithèque de Hamlyni	?	Congo-RDC-Rwanda	282
			<i>Allenopithecus</i>		<i>nigrovidis</i>	singes des marais	?	Congo	240
					<i>talapoin</i>	talapoin du sud	SIVtal*	Angola-Congo-RDC	295
			<i>Miopithecus</i>		<i>ogouensis</i>	talapoin du nord	SIVtal	Cameroun (sud Sanaga)-Gabon	230, 304
			<i>Erythrocebus</i>		<i>patas</i>	singe rouge	SIVagm-sab*	Sénégal-Ethiopie/Tanzanie	53
			<i>Chlorocebus</i>		<i>sabaeus</i>	sabeus	SIVagm-Sab	Sénégal-rivière Volta	14, 51, 191, 272
					<i>aethiops</i>	grivet d'Ethiopie	SIVagm-Gri	Soudan/Erythrée/Ethiopie	132, 191, 193
					<i>tantalus</i>	cercoptithèque tantale	SIVagm-Tan	Ghana-Ouganda	170, 190, 272, 369
					<i>pygerythrus</i>	vervet	SIVagm-Ver	De l'Est au Sud de l'Afrique-Somalie/Angola	136, 191, 192

* virus partiellement séquencé
? sérologie +

du gène *vpu* simplement parce qu'ils descendent en partie de cette lignée de lentivirus de guenon dont ils ont acquis la partie 3' (*vpu* à *nef* inclus). Le chimpanzé est connu comme étant le seul primate non-humain à chasser d'autres primates (colobes et guenons) pour sa subsistance (267, 383) (Photo 3). Ce qui renforce l'hypothèse de l'acquisition du SIVcpz par le chimpanzé par transmission inter-espèces à travers les contacts avec d'autres espèces naturellement porteuses d'un SIV. Ainsi, un seul lentivirus (SIVcpz) est identifié chez les grands singes d'Afrique, en l'occurrence les chimpanzés et tous les autres sont portés par des petits singes d'Afrique.



Photo 3. Chimpanzés consommant un colobe (tirée de « Planète Singes nos cousins les primates », édition Octavo, 2000, pp 180).

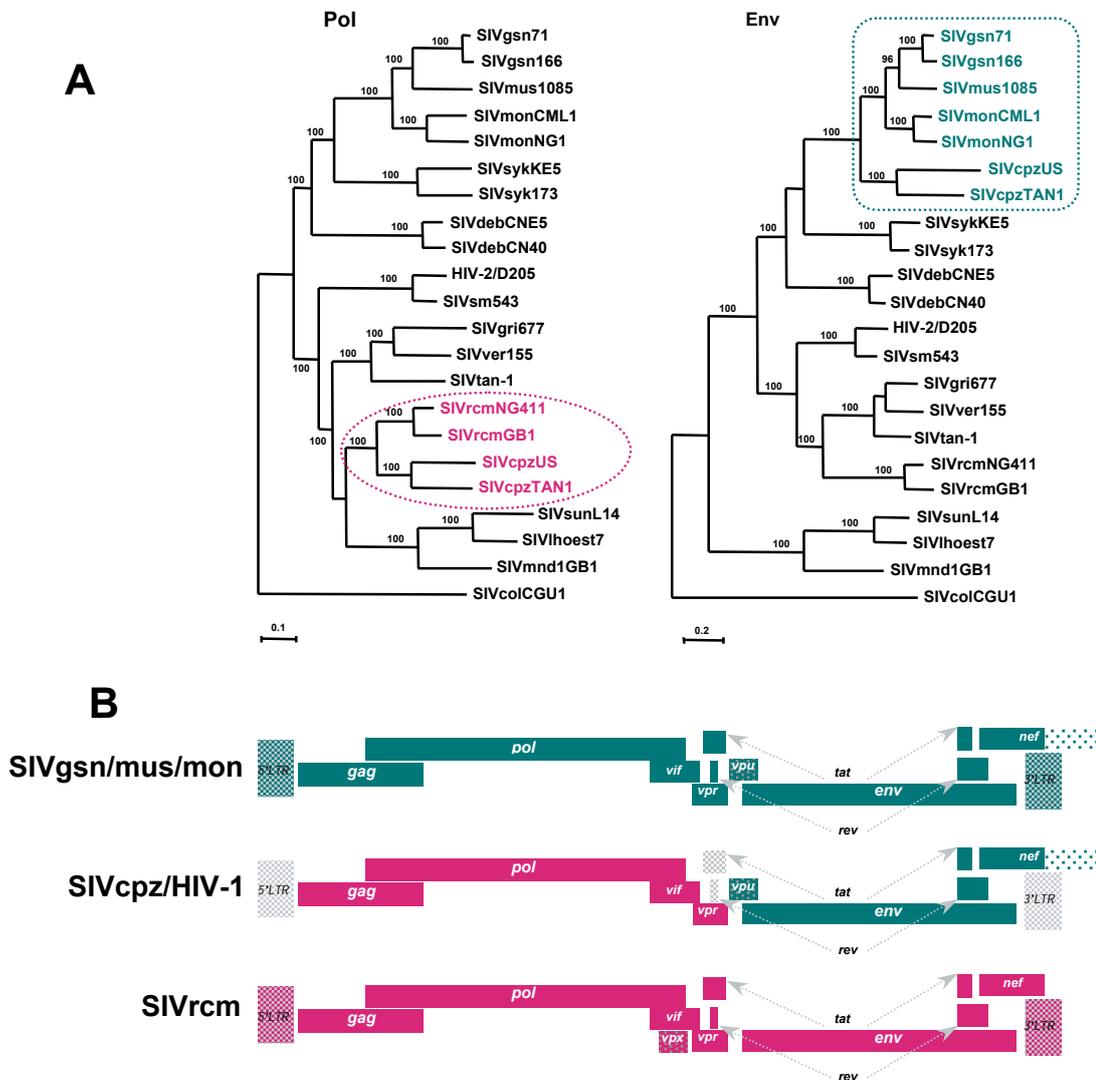


Figure 14. Origine recombinante du SIVcpz. **A:** Phylogénie des lentivirus de primates dans Env et Pol adaptée de Bibollet-Ruche et al. 2004; montrant la proximité des SIVcpz=SIVrcm dans Pol et SIVcpz=SIVgsn/mus/mon dans Env. **B:** Diagrammes schématiques de l'organisation génomique du SIVcpz par rapport aux SIVrcm et SIVgsn/mus/mon. Les gènes *nef* et *env* du HIV-1 et du SIVcpz ne se chevauchent pas, contrairement au cas des SIVgsn, mus et mon.

2. Infections à SIV chez les petits singes

Les petits singes ou singes de l'ancien monde appartiennent à la famille des *Cercopithecidae*, qui est divisée en deux sous-familles: la sous-famille des *Colobinae* et celle des *Cercopithecinae*. La sous-famille des *Colobinae* comprend trois genres que sont: le genre *Colobus*, le genre *Ptilocolobus* et le genre *Procolobus*. Chez les *Cercopithecinae*, on a deux tribus que sont la tribu des *Papionini* composée de babouins (*Papio sp*), de mandrills et drills (*Mandrillus sp*), de cercocèbes (*Cercocebus sp*) et de lophocèbes (*Lophocebus sp*), et la tribu des *Cercopithecini* qui regroupe les singes verts d'Afrique (*Chlorocebus sp*), les singes rouges (*Erythrocebus sp*), les singes des marais (*Allenopithecus sp*), les talapoins (*Miopithecus sp*) et enfin les cercopithèques (*Cercopithecus sp*) qui représentent le groupe majoritaire (157). D'après Colin Groves, 65 espèces de primates africains appartiennent à la famille des *Cercopithecidae* (157). L'utilisation des tests commercialisés pour le diagnostic sérologique des infections à HIV-1/2 a permis par réactions croisées d'identifier une infection à SIV chez 36 (55%) de ces espèces. L'amplification génomique et l'analyse des séquences ont permis de confirmer l'infection à SIV chez 30 (45%) de ces espèces, illustrant l'étendu de l'infection chez ces primates (Tableau 2). De plus il est fort possible que cette prévalence soit sous-estimée dans la mesure où plusieurs espèces n'ont pas encore été testées, et certaines espèces testées l'ont été sur un nombre limité d'échantillons. D'autre part, il n'est pas exclu que les outils de diagnostic utilisés ne soient pas assez sensibles pour identifier tous les SIV circulants dans la mesure où ils étaient initialement destinés au dépistage du HIV et non du SIV (5).

3. Phylogénie des lentivirus des primates

Les analyses phylogénétiques des différents SIV ont permis de constater une co-spéciation de l'hôte et du virus ou évolution hôte-virus, c'est-à-dire que les SIVs identifiés chez les primates d'une même espèce sont plus proches entre eux que des SIVs des autres espèces, d'où la classification des lentivirus simiens en lignées phylogénétiques distinctes (Figure 15):

– La lignée *SIVcpz/HIV-1* regroupe le SIVcpz isolé chez le chimpanzé (*Pan troglodytes*) (93, 140, 180, 187, 305, 307, 343, 345, 347, 412, 434) et le HIV-1 responsable de la pandémie SIDA chez l'homme (42, 227). Plus de 350 génomes complets de HIV-1 ont été caractérisés à ce jour, ce qui fait du HIV-1 le virus le mieux caractérisé. En revanche, seulement une dizaine de souches SIVcpz



Photo 4. Chimpanzé (*Pan troglodytes*).
<http://www.arkive.org/species/>.

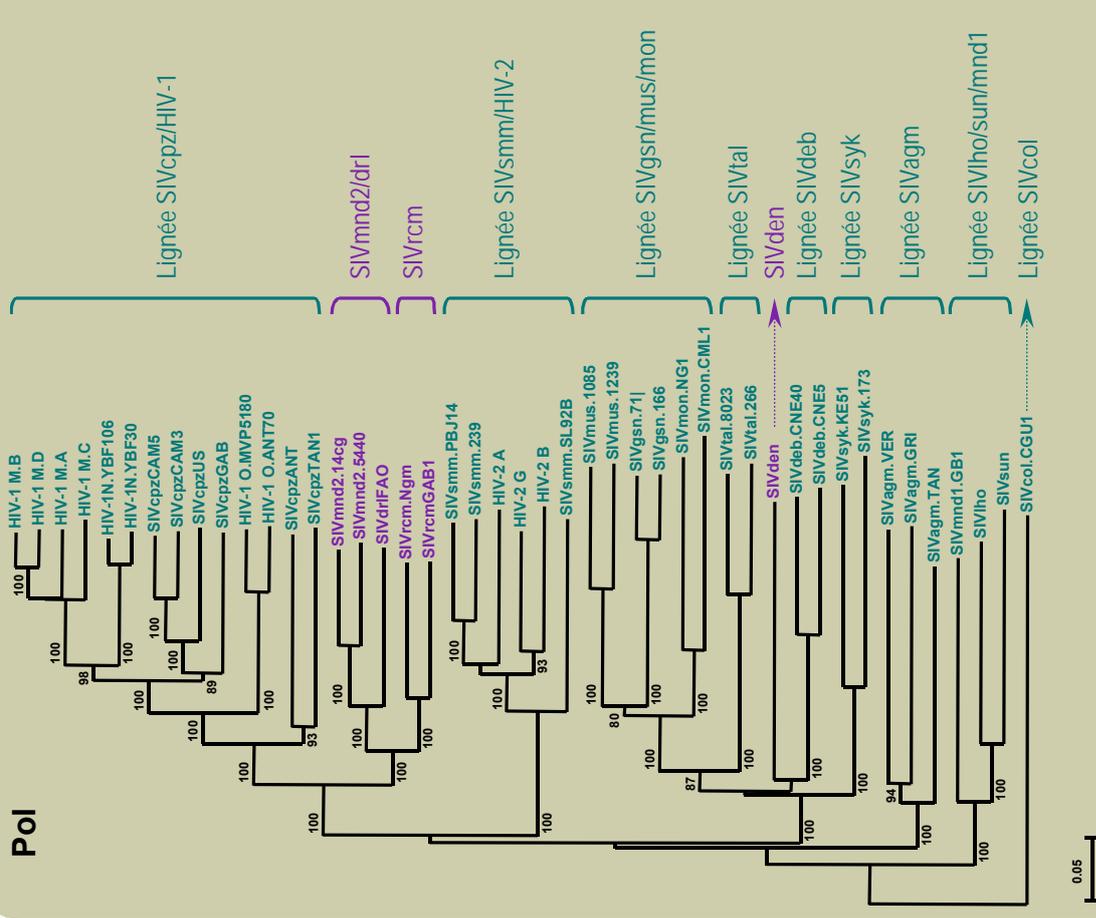
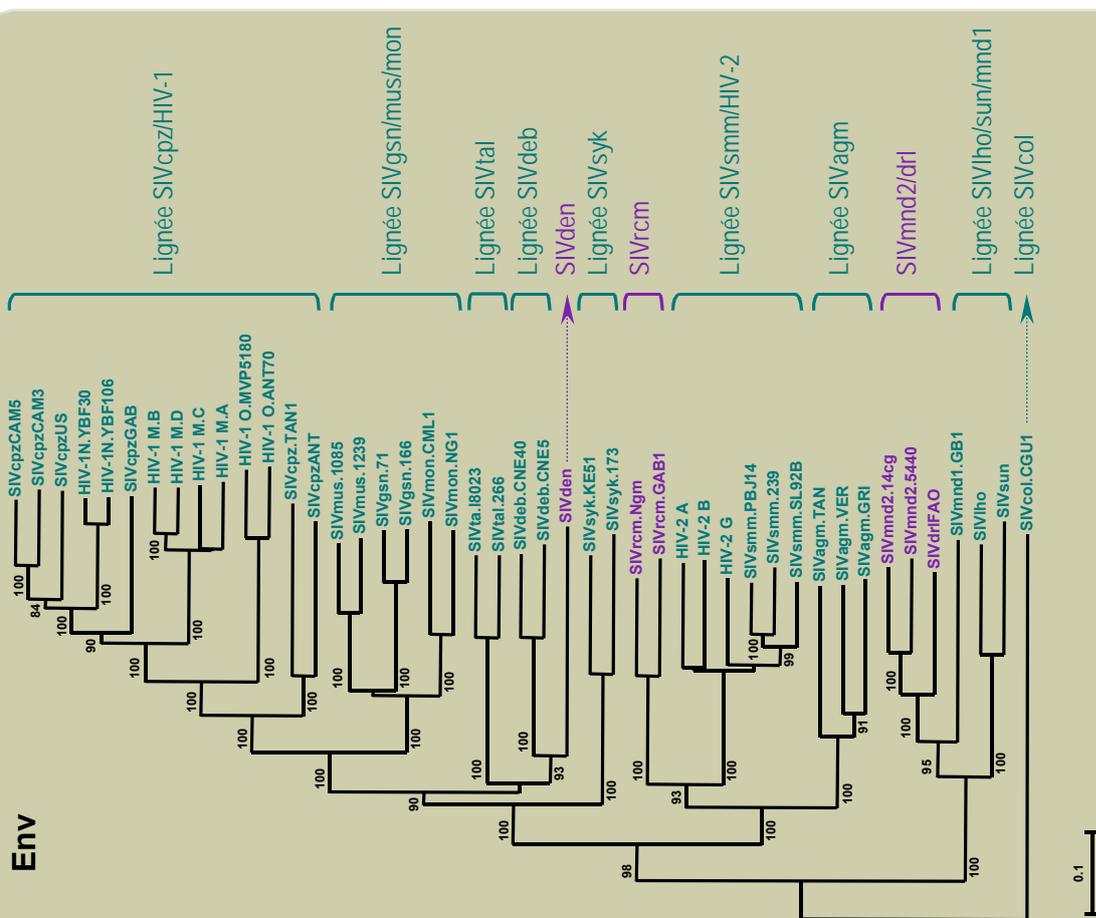


Figure 15. Relations phylogénétiques entre différents lentivirus de primates caractérisés en génomes complets, illustrant différentes lignées SIV/HIV. Les arbres phylogénétiques ont été réalisés à partir de séquences nucléotidiques des gènes *pol* et *env* par la méthode du plus proche voisin (Saitou and Nei, 1987). Les neuf lignées SIV actuellement reconnues sont en bleu et les virus mosaïques (SIVrcm, SIVmnd2 et SIVdrl) ou non encore confirmés dans la nature (SIVden) sont en violet.

ont été décrites à ce jour. Si l'étude et la caractérisation de ces isolats ont permis de déterminer l'origine du HIV-1, beaucoup reste encore à faire pour mieux comprendre l'épidémiologie du SIVcpz. La prévalence des infections à SIV chez les chimpanzés sauvages est mal connue, beaucoup d'études ayant été réalisées sur des animaux en captivité qui pour la plupart sont acquis par les zoos à très jeune âge, les infections observées dans ces cas pouvant donc résulter de transmissions verticales. Le chimpanzé étant une espèce protégée, le développement des techniques non invasives permettra une meilleure estimation de la prévalence du SIVcpz dans la nature (343).

– La lignée **SIVsmm/HIV-2** comprend le SIVsmm du mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) qui est phylogénétiquement très proche du HIV-2 et du SIVmac du macaque (*Macaca mulatta*) (26, 77, 138, 171, 232, 253, 275, 308). Si le HIV-2 est le résultat de plusieurs transmissions inter-espèces de SIVsmm du mangabey enfumé à l'homme, générant ainsi les HIV-2 group A à H, le SIVmac quant à lui est plus vraisemblablement le résultat de transmissions inter-espèces entre mangabeys enfumés et macaques vivant en captivité dans les mêmes centres de primatologie. Les séquences de SIVsmm provenant des mangabeys enfumés de Sierra Léone, Libéria et Côte d'Ivoire montrent une très grande variabilité des SIVsmm, ce qui se reflète aussi sur la diversité du HIV-2 (26, 76, 77, 253, 308).



Photo 5. mangabey enfumé (*Cercocebus atys*).
<http://www.psych.upenn.edu/>.

– La lignée **SIVagm** est composée de SIV isolés des quatre espèces de singes verts d'Afrique (*agm* = *African green monkey*) que sont les grivets (*Chlorocebus aethiops*) retrouvé en Ethiopie et au Soudan, les vervets (*Chlorocebus pygerythrus*) retrouvés de l'est au sud de l'Afrique, les tantalus (*Chlorocebus tantalus*) présents en Afrique centrale et les sabaeus (*Chlorocebus sabaesus*) rencontrés en Afrique de l'ouest (14, 33, 106, 132, 136, 157, 170, 191, 193, 229, 272, 369). On pense que les SIVagm (SIVagmVer, SIVagmGri, SIVagmTan et SIVagmSab) ont évolué en parallèle avec leurs hôtes dans la mesure où ils sont phylogénétiquement très distincts, mais néanmoins plus proches entre eux que des autres SIVs (169, 191, 193). Cependant, le SIVagmSab du sabeus est un virus recombinant. En effet, dans la région 3' *gag* et 5' *pol* il se groupe avec le SIVrcm et dans le reste du génome avec les SIVagm (46, 191). La prévalence du SIVagm chez le singe vert d'Afrique dans la nature est supérieure à 50% (51, 272, 291). Cette prévalence est corrélée à l'âge du primate et peut atteindre 80% chez les individus adultes (27, 312).



Photo 6. AGM (*Chlorocebus aethiops*).
<http://www.bioparco.it/>

– La lignée *SIVsyk* comprend les SIVs isolés du cercopithèque à diadème (*Cercopithecus albogularis*) ou singe de Sykes au Kenya (50, 122, 168). Cette lignée est actuellement représentée par deux génomes complets et des études de séroprévalences font état d'un fort taux d'infection chez ces primates, de l'ordre 50% en captivité et jusqu'à 70% chez les animaux sauvages (121).



Photo 7. Cercopithèque à diadème (*Cercopithecus albogularis*). <http://liboupat2.free.fr/>.

– La lignée *SIVlho/SIVmnd* regroupe les virus isolés des mandrills (*Mandrillus sphinx*) (400) et de la super-espèce *l'Hoesti* dans lequel on trouve le cercopithèque de l'Hoest (*Cercopithecus lhoesti*), le cercopithèque à queue de soleil (*Cercopithecus solatus*) et le cercopithèque de Preuss (*Cercopithecus preussi*) (44, 45, 167, 344). Initialement représentée depuis 1988 uniquement par SIVmnd-1 (400), cette lignée s'est élargie 10 ans plus tard avec l'identification et la caractérisation des SIVlho et SIVsun (45, 167). La prévalence du SIVlho est assez élevée, Beer et al. ont trouvé une prévalence de 57% sur un panel de 14 animaux sauvages testés, suggérant que le cercopithèque de l'Hoest est porteur naturel du SIVlho (44). Quant au SIVmnd-1, il est possible qu'il soit le résultat d'une transmission inter-espèce du SIVsun du *C. solatus* au mandrill avec lequel il partage le même habitat naturel au Gabon (388).



Photo 8. Cercopithèque de l'Hoest (*Cercopithecus lhoesti*). <http://www.rwandatourism.com/>.

– La lignée *SIVcol* représente les virus isolés du colobe guéréza (*Colobus guereza*) au Cameroun, qui sont les SIVs les plus divergents jamais caractérisés (97). La séparation des colobes des autres singes de l'ancien monde ayant eu lieu depuis au moins 11 millions d'années (297), la divergence observée entre le SIVcol et les autres SIV pourrait refléter la divergence des hôtes, corroborant ainsi l'hypothèse d'un ancêtre commun à tous les SIV et la diversification des virus parallèlement à celle des hôtes. La prévalence du SIVcol chez le colobe guéréza dans la nature est considérable, de l'ordre de 30 % (5, 97). Récemment deux autres lentivirus ont été identifiés chez les singes de la sous-famille des *Colobinae* en Côte d'Ivoire, le SIVolc du colobe de Van Beneden (*Procolobus verus*) et SIVwrc du colobe bai d'Afrique occidentale (*Piliocolobus badius*) (96). Cependant, ces virus ne semblent pas avoir la même origine que le SIVcol, car ils se groupent plutôt avec les virus de la lignée SIVlho/sun/mnd1 (96).



Photo 9. Colobe guéréza (*Colobus guereza*) (tirée de « Planète Singes nos cousins les primates », édition Octavo, 2000. pp 180).

– La lignée **SIV_{gsn/mus/mon}** regroupe les virus isolés des trois guenons que sont : le singe hocheur ou GSN pour greater spot nosed (*Cercopithecus nictitans*), le moustac (*Cercopithecus cephus*) et le cercopithèque mona (*Cercopithecus mona*) (40, 95, 98). Ces trois primates du genre *Cercopithecus* sont porteurs de SIV phylogénétiquement très proches, mais appartiennent à des groupes de singes distincts (*Mitis*, *Cephus* et *Mona*), ce qui exclu l'acquisition de leur virus par le biais d'un ancêtre commun. Cependant, ces trois espèces vivent sur des territoires qui se chevauchent et des associations polyspécifiques ont été rapportées suggérant des transmissions inter-espèces (95, 147). Dans ces conditions, le SIV_{gsn}, le SIV_{mus} et le SIV_{mon} seraient le résultat de co-spéciation avec les hôtes après des transmissions inter-espèces. Ces virus sont porteurs d'un gène *vpu*, qui jusqu'à très récemment était spécifique à la lignée SIV_{cpz}/HIV-1. De plus, ils sont remarquablement proches du SIV_{cpz} dans l'enveloppe (35, 95, 361) (Figure 14). La connaissance de ces nouvelles données après la découverte des virus de la lignée SIV_{gsn/mus/mon}, a permis de reconsidérer la phylogénie du SIV_{cpz} qui est actuellement reconnu comme recombinant entre précurseurs des virus de la lignée SIV_{gsn/mus/mon} et du SIV_{rcm} (35, 361). L'évolution des virus de cette lignée sera davantage discutée dans les travaux de thèse.



Photo 10. Singe hocheur (*Cercopithecus nictitans*). <http://www.bioko.org/>.

– La lignée **SIV_{deb}** représente le lentivirus isolé du cercopithèque De Brazza (*Cercopithecus neglectus*) (50, 304). Ce virus est décrit chez les singes De Brazza du Cameroun et d'Uganda et bien que les souches identifiées dans les deux pays se groupent séparément en fonction de leur origine géographique, ils forment tous un group monophylétique (50). La prévalence de l'infection à SIV chez les singes De Brazza est assez importante, de l'ordre de 40% (5).



Photo 11. Cercopithèque De Brazza (*Cercopithecus neglectus*). <http://www.bluegreenpictures.com/>.

– La lignée **SIV_{tal}** est celle d'un virus isolé du talapoin (*Miopithecus sp*) et qui forme un groupe phylogénétique distinct des autres SIV. Initialement partiellement décrit chez un talapoin en captivité de l'espèce *M. talapoin* ou talapoin du sud d'Angola, ce virus n'a été que récemment identifié et caractérisé sur la totalité de son génome chez les primates sauvages de l'espèce *M. ogouensis* ou talapoin du nord au Cameroun (230, 295, 304). Les analyses phylogénétiques des séquences SIV_{tal} isolées chez les talapoins du sud en captivité et chez les talapoins du nord dans la nature montrent que



Photo 12. Talapoin (*Miopithecus ogouensis*). Réalisée par les chercheurs de l'UMR-145 IRD.

les virus des deux espèces sont très proches. Il est donc possible que les deux populations de talapoin géographiquement séparées aient acquis leur virus à travers un ancêtre commun avant la différenciation et la séparation des deux espèces, ou plus simplement que les talapoin de sud en captivité aient été infectés par contact avec ceux du nord dans des zoos. Seule la confirmation de l'infection à SIVtal chez les talapoin du sud dans la nature permettra d'élucider l'évolution du SIVtal chez ces primates (230).

– Le *SIVrcm* du cercocèbe à collier blanc (*Cercocebus torquatus torquatus*) a une organisation génomique similaire à celle des virus de la lignée SIVsm/SIVmac/HIV-2, mais les analyses phylogénétiques montrent qu'il est assez divergent de ce groupe de virus et qu'il possède une structure mosaïque (46, 149). En effet, ce virus est proche de SIVagmSab dans *gag*, du SIVcpz dans *pol-vif* et de SIVsm dans *env-nef* (46). Des études récentes montrent que l'origine du SIVcpz est liée à des événements de recombinaison entre précurseurs du SIVrcm et des SIVgsn/mus/mon, ce qui explique la similitude entre SIVcpz et SIVrcm dans la région *pol-vif* (35). Le SIVrcm a été caractérisé chez les cercocèbes à collier blanc au Gabon, au Cameroun et au Nigeria prouvant que ce primate est naturellement porteur de cette infection (46, 149, 280).



Photo 13. Cercocèbe à collier blanc (*Cercocebus t. torquatus*). <http://zoo.rin.ru/>.

– le *SIVmnd2* et le *SIVdrl* sont respectivement isolés du mandrill (*Mandrillus sphinx*) et du drill (*Mandrillus leucophaeus*) (83, 178, 371, 384). Ces virus ont tous deux une structure mosaïque : proche de SIVrcm dans *gag*, *pol*, *vif*, *vpx* et *tat*, et proche du SIVmnd1 dans *env-nef* (178, 371). Les mandrills sont présents au sud de la rivière Sanaga au Cameroun, au Gabon et à l'ouest du Congo (157). Seuls les mandrills vivant au nord de la rivière Ogooué au Gabon et au Cameroun sont porteurs du SIVmnd2. Au sud de la rivière Ogooué les mandrills sont infectés par un autre lentivirus : le SIVmnd1, très divergent du SIVmnd2. Les deux virus n'ont pas la même organisation génomique et ne sont proches que dans la partie *env-nef*. L'origine du SIVmnd1 semble liée au SIVsun (voir lignée SIVlho/SIVmnd) alors que celle du SIVmnd2 semble liée aux SIVrcm et SIVmnd1 (371, 388). Cette exception unique du mandrill démontre que les primates non-humains peuvent être naturellement et efficacement infectés par plusieurs types de lentivirus. Il est possible que le SIVmnd2 soit le résultat de recombinaisons entre SIVmnd1 et SIVrcm (l'habitat des cercocèbes à collier blanc chevauchant celui des mandrills), à la suite de transmissions inter-espèces entre mandrills porteurs de SIVmnd1 et cercocèbes à collier blanc



Photo 14. Mandrills (*Mandrillus sphinx*). <http://www.primates.com/>.

(371). Quant au SIVdr1, la similitude avec le SIVmnd2 suggère une origine commune et sa présence chez le drill pourrait s'expliquer par des transmissions inter-espèces entre les drills et mandrills. Cependant, les territoires de ces deux primates sont séparés par la rivière Sanaga au Cameroun, affaiblissant cette hypothèse. Néanmoins, des transmissions inter-espèces ont récemment été décrites entre ces deux primates prouvant que cette possibilité ne peut être exclue sans davantage d'investigations (178, 405). La prévalence des infections à SIVmnd est parmi les plus élevées, de l'ordre de 50% (5, 371).



Photo 15. Drills (*Mandrillus leucophaeus*).
<http://www.grida.no/>.

4. Infection à SIV chez les cercopithèques

Le genre *Cercopithecus* est celui qui regroupe le plus grand nombre d'espèces naturellement porteuses d'un SIV. Ainsi, l'hypothèse d'une lignée SIV spécifique aux cercopithèques incluant les SIVgsn, SIVmus, SIVmon, SIVsyk, SIVdeb et SIVden (108) a récemment été suggérée (50). Plusieurs éléments sont en effet en faveur de l'existence d'une telle lignée. Tout d'abord, tous ces virus forment un groupe sur un arbre phylogénétique, que ce soit dans les régions Gag, Pol ou Env (Figure 16). De plus, ils ont en commun plusieurs motifs fonctionnels dont certains leur sont spécifiques. La tige-boucle TAR présente une structure secondaire similaire chez ces virus, avec une inhabituelle courte tige (3 pb). De plus, ils ont un nombre identique de résidus cystéine sur leur glycoprotéine d'enveloppe de surface (gp120) et une forte affinité pour le site de fixation du AIP1 (YPS/DL) sur leur protéine Gag p6 (50). Les analyses des séquences partielles des autres SIV de cercopithèques, SIVery (*C. erythrotis*), SIVasc (*C. ascanius*) et SIVblu (*C. mitis*) montrent que ces virus se regroupent avec ceux des autres cercopithèques et confirment cette hypothèse (50, 416). La lignée SIVtal caractérisée chez les talapains (*Miopithecus sp*) se groupe avec cette lignée SIV de cercopithèques et partage plusieurs motifs fonctionnels avec ces virus. Il est possible que le SIVtal soit le résultat de transmissions inter-espèces entre cercopithèques et miopithèques et d'autre part la taxonomie des talapains a toujours porté à controverse, certains auteurs les classant parmi les cercopithèques (230, 404). Deux virus de cercopithèques n'obéissent pas à cette observation, le SIVlho et le SIVsun, mais une nouvelle taxonomie des primates suggère que les cercopithèques de l'Hoest et à queue de soleil n'appartiendraient pas au genre *Cercopithecus* et seraient plus proches d'autres guenons terrestres des espèces *Chlorocebus* et *Erythrocebus* (394), renforçant ainsi l'hypothèse d'une lignée SIV des cercopithèques.

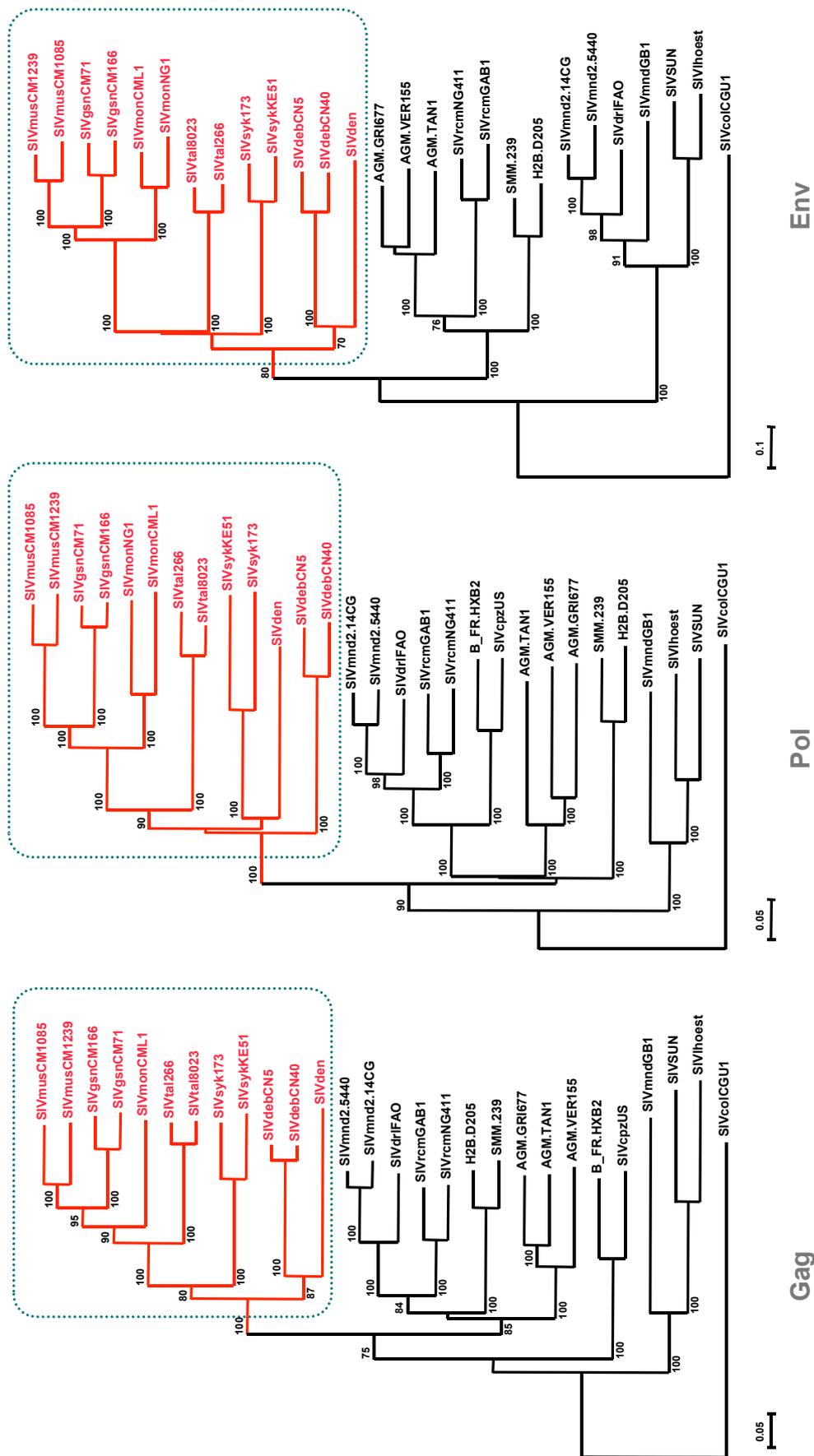


Figure 16. Arbres phylogénétiques illustrant la lignée SIV de cercopithèques dans Gag, Pol et Env. La lignée de virus de cercopithèques représentés en rouge est entourée de pointillés bleus dans les trois régions du génome. Les arbres phylogénétiques ont été réalisés à partir de séquences protéogénétiques des régions Gag, Pol et Env par la méthode du plus proche voisin (Saitou and Nei, 1987).

Au vue de ce récapitulatif de la diversité des lentivirus simiens, il apparaît que leur origine et leur évolution sont des processus longs et complexes. L'hypothèse d'un ancêtre SIV commun suivi d'une diversification parallèlement à l'évolution de leur hôte a très souvent été avancée, mais n'est pas soutenue par les estimations de l'horloge moléculaire (176, 359). D'autres mécanismes doivent être pris en considération pour répondre à certaines observations, il s'agit entre autres de la transmission inter-espèces très souvent favorisée par le chevauchement des habitats des primates et des recombinaisons qui sont à l'origine des virus mosaïques. De plus les transmissions inter-espèces suivies ou pas de recombinaisons peuvent être masquées par une co-évolution hôte-virus sur une longue période et fausser ainsi les phylogénies attribuées. D'autres part, tous les lentivirus de primates n'ayant certainement pas encore été identifiés et complètement caractérisés, il est actuellement difficile d'établir les relations réelles entre ces différents virus. La caractérisation de nouveaux virus remettra continuellement en cause cette classification des lentivirus de primates, mais permettra aussi de mieux définir leur phylogénie et leur évolution. Enfin, une meilleure connaissance des hôtes (taxonomie, évolution, comportements sociaux ...) par la primatologie fournira des informations indispensables à la compréhension de l'origine et de l'évolution des lentivirus de primates.

C. PATHOGENICITE DES LENTIVIRUS SIMIENS

Il est généralement admis que l'infection à SIV chez leurs hôtes naturels que sont les primates non-humains n'est pas pathogène (161). Ceci se justifiant par le fait qu'il n'est pas courant d'observer chez les primates naturellement infectés, les signes d'un SIDA. Cependant, quelques études ont montré que l'infection à SIV chez leurs hôtes naturels peut éventuellement conduire au développement d'une immunodéficience chez une minorité de cas. En effet, de rares cas de SIDA ont été rapportés chez le mandrill infecté par le SIVmnd1 (298), chez le mangabey enfumé infecté par le SIVsmm (231) et chez un singe vert d'Afrique co-infecté par le SIVagm et le STLV (395). Quelques cas de SIDA ont aussi été décrits chez des primates infectés par un SIV hétérologue : tous les macaques infectés par SIVsmm (275), babouins infectés par HIV-2 (41), quelques chimpanzés infectés par HIV-1 (285, 289) et un mangabey noir infecté par SIVsmm (21). Néanmoins, ces cas sont extrêmement rares, sûrement du fait de l'adaptation hôte-virus qui permet aux primates naturellement infectés de bénéficier d'une période d'incubation du virus très longue, voire supérieure à leur espérance de vie moyenne (161). Ce qui expliquerait le fait que tous les cas de SIDA rapportés chez les primates naturellement infectés concernent des animaux d'un âge assez avancé.

D. LES RISQUES DE NOUVELLES ZONOSSES

Les HIV-1 et 2 sont les résultats de transmissions zoonotiques de SIV du singe à l'homme. Il est maintenant démontré que ces transferts se sont effectués de façon indépendante et ce à différentes occasions (au moins 8) (161). Le fait que deux primates aussi différents que le chimpanzé et le mangabey enfumé soient les hôtes naturels et les réservoirs de pathogènes responsables d'une pandémie telle que le SIDA est extrêmement inquiétant dans la mesure où plus d'une trentaine d'autres espèces de primates africains sont porteurs d'un



Photo 17. Primate chassé pour la consommation ou le commerce. <http://lineair.weonline.com/>.

SIV. Les conditions et les circonstances exactes de transfert du SIVcpz et du SIVsmm de leurs hôtes naturels à l'homme restent indéterminées, mais certaines pratiques encore courantes comme la chasse et le dépeçage des primates chassés, les morsures par les primates domestiques peuvent expliquer ces transmissions (161). Une étude séro-épidémiologique récemment menée sur la "viande de brousse" de singe vendue sur des marchés camerounais a montré que les populations locales étaient exposées à une diversité considérable de

SIV (304). La chasse et la consommation de "viande de brousse" en Afrique subsaharienne ont toujours été pratiquées car représentent une source non-négligeable de revenus et de protéines (29, 148). L'exploitation forestière dans ces régions a favorisé le développement de cette activité avec l'accessibilité aux zones forestières jusque-là préservées, et amplifiant par la même occasion les risques de contact des populations avec des espèces diverses et l'émergence de nouvelles zoonoses (304). Des études socio-épidémiologiques autour des concessions forestières ont montré des prévalences de l'infection à HIV assez importantes, atteignant 20% chez les jeunes femmes libres (221), d'où la possibilité d'émergence de nouveaux virus recombinants SIV-HIV (304). Certains SIV en dehors du SIVcpz et du SIVsmm ont la capacité de se répliquer *in vitro* dans les cellules humaines, démontrant ainsi qu'ils ont le potentiel d'émerger dans la population humaine (153).



Photo 16. Primate chassé pour la consommation ou le commerce. <http://www.ucl.ac.uk/>.



Photo 18. Primates chassés pour la consommation ou le commerce. <http://lineair.weonline.com/>.



Figure 17. Carte détaillée du Cameroun (www.izf.net).

V. CAS PARTICULIER DU CAMEROUN

Le Cameroun est un pays presque aussi grand que la France, situé à l'ouest de l'Afrique centrale et peuplé d'environ 15 millions d'habitants (Figure 17). Ce pays d'une grande diversité culturelle, ethnique, géographique et zoologique, a aussi le triste palmarès de la plus forte diversité génétique du HIV-1.

A. PARTICULARITE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DU HIV AU CAMEROUN

En fin 2003, l'ONUSIDA estimait à 6,9% (4,8 – 9,8) la prévalence de l'infection à HIV dans la population adulte (15 à 49 ans) camerounaise, avec près de 520 000 (360 000 – 740 000) personnes vivant avec le virus et plus de 50 000 (32 000 – 74 000) décès attribué au SIDA au courant de la même année (293). Une récente étude de surveillance sanitaire réalisée en 2004 par les autorités camerounaises fait état d'une prévalence de 5,5% dans la population générale, avec un ratio sexe de 1,7 femmes pour 1 homme (Ministère de la Santé Publique, Cameroun. 2004). Ces estimations de prévalence sont similaires à celles des autres pays de l'Afrique centrale situées entre 4 et 13% (293). Cependant, l'infection à HIV au Cameroun est caractérisée par une extraordinaire diversité génétique des souches HIV-1 circulantes.

Dès le début des années 90, des souches HIV particulièrement divergentes de celles déjà décrites sont isolées chez des patients camerounais, présentant des signes de sida, mais séronégatifs aux tests de diagnostic courants (73, 111, 160, 411). Les analyses phylogénétiques et des séquences montreront que les nouveaux virus se regroupent avec les virus de la lignée HIV-1/SIVcpz dans un arbre phylogénétique et qu'ils ont une organisation génomique similaire à celle des HIV-1 connus, avec la présence d'un gène *vpu*. Les virus HIV-1 seront donc classés en deux groupes, le groupe M (Major ou Main) qui regroupera la majorité des virus responsables de la pandémie déjà identifiée et le groupe O (Outlier) sera attribué à ces nouveaux virus HIV-1 divergents. 1 à 5% des cas d'infection à HIV au Cameroun sont attribués au groupe O qui reste endémique uniquement à l'ouest de l'Afrique centrale et particulièrement au Cameroun.

En 1997, un nouveau virus avec la même organisation génomique que le HIV-1 et le SIVcpz, phylogénétiquement équidistant des groupes M et O sera isolé chez un patient camerounais présentant des signes de SIDA et sera le premier représentant d'un troisième groupe de virus HIV-1 : le groupe N (non-M/non-O ou New) (366). Depuis, ce groupe de virus n'a été identifié que chez quelques patients et uniquement au Cameroun (59, 336, 366).

Cette singularité du Cameroun en thème de diversité du HIV a conduit à la réalisation de nombreuses études sur la diversité génétique du HIV dans ce pays, aussi bien en zones urbaines que rurales (3, 66, 70, 133, 257, 258, 269, 278, 287, 288, 385, 390, 396, 437). Toutes les études réalisées à ce jour font état d'une importante diversité génétique du HIV-1 au Cameroun, caractérisée par la co-circulation des groupes M, N et O, mais aussi par la présence de nombreux sous-types du groupe M. La forme recombinante CRF02_AG est prédominante et représente environ 70% des souches HIV-1 au Cameroun. Les sous-types A, en particulier A1 et A2, le sous-type F (uniquement F2), ainsi que les sous-types B, D, G, H et J et les recombinants CRF01_AE, CRF06cpx, CRF11cpx et CRF13cpx représentent les autres variants HIV-1 rencontrés au Cameroun à des proportions légèrement variables d'une région à l'autre. Des recombinants inter-groupes HIV-1 ont aussi été décrits au Cameroun, plus particulièrement les recombinants M/O (309, 386) et il n'est pas impossible qu'on puisse dans le futur identifier des recombinants M/N, N/O ou M/N/O. Cette importante diversité génétique des HIV-1 au Cameroun a des conséquences sur les stratégies de lutte contre l'infection dans ce pays, particulièrement en terme de diagnostic et de prise en charge thérapeutique.

B. ACCES AU DIAGNOSTIC ET AU TRAITEMENT

Depuis 1987 le Cameroun s'est doté d'un Comité National de Lutte contre le SIDA (CNLS) qui a élaboré différents programmes de lutte contre la pandémie dont le dernier rédigé en septembre 2000 intitulé "*Plan Stratégique de lutte contre le SIDA au Cameroun 2000-2005*" avait pour objectif d'évaluer toutes les stratégies précédentes, et entreprendre un certain nombre d'actions pour réduire la prévalence, sensibiliser la population sur la maladie, réduire la transmission mère-enfant, élargir la prise en charge des personnes vivant avec le SIDA en impliquant toutes les couches politico-sociales du pays (156).

1. Accès au diagnostic

D'après ce plan stratégique, la prévention passe par le diagnostic des personnes infectées. Ce diagnostic peut être volontaire et anonyme ou à la demande d'un professionnel de la santé et doit être obligatoire chez les femmes enceintes. Il est pratiqué par les laboratoires de référence publics ou privés et les coûts ont été revus à la baisse. Pour favoriser le diagnostic volontaire, celui-ci est beaucoup moins coûteux que celui prescrit par un praticien. Un test de dépistage, le Camstix HIV-1/2 est produit localement et permet l'accès

au diagnostic à moins de deux dollars pour le patient. Une étude a été réalisée sur la fiabilité de ce test de diagnostic (3) (voir Travaux de thèse). La sécurité transfusionnelle est assurée par la recherche sur toutes poches de sang destinées à la transfusion, du HIV et du virus de l'hépatite B (156).

2. Accès au traitement

La prise en charge thérapeutique des personnes vivant avec le HIV est plus complexe à mettre en place, particulièrement à cause de l'absence d'un système de sécurité social au Cameroun, des conditions socio-économiques difficiles, et de la diversité des souches circulantes. A cela il faut ajouter le conflit médecine traditionnelle/médecine moderne qui ne facilite pas le suivi des patients. Néanmoins, plusieurs efforts ont été faits pour faciliter l'accès aux traitements pour les patients Camerounais. En effet grâce à des financements de la Banque Mondiale, Fond Mondial, Programmes PPTe (Pays Pauvres Très Endettés) et autres, l'accès aux ARV est facilité (i) grâce à la réduction des coûts des molécules à travers les subventions de ces organismes et (ii) par la disponibilité des combinaisons d'ARV génériques en dose unique qui allient efficacité et faible coût, à l'exemple de la triomune actuellement utilisée au Cameroun, qui combine la névirapine, la stavudine et la lamivudine pour un coût mensuel de 3000 franc CFA (environ US \$ 4) (222). Des efforts sont aussi consentis en vue d'une amélioration de la prise en charge et du suivi biologique des patients à travers la réduction des coûts des examens biologiques et l'installation de plateformes d'analyse utilisant les techniques alternatives de numération CD4 et de quantification de la charge virale. Enfin, pour permettre aux populations des provinces et des zones rurales un accès aux traitements et au suivi, un processus de décentralisation est en cours d'initiation. Cependant, ce programme d'accès aux ARV se heurte à de nombreuses difficultés que sont: (i) la diversité génétiques des HIV circulant au Cameroun (sous-types G et F, groupe O et recombinants M/O naturellement résistants à certaines classes de molécules) (20, 117, 118), la circulation du groupe O par exemple ne facilite pas l'utilisation de la triomune du fait de la résistance naturelle de ce groupe de virus au INNRT (la névirapine) (222); (ii) l'émergence des résistances aux ARV au Cameroun dévoile un peu plus les faiblesses du système de suivi des patients dans la mesure où il est d'abord difficile d'évaluer l'ampleur de ces résistances et les alternatives en cas de résistance sont limitées par les difficultés économiques et enfin; (iii) le manque de structures biomédicales et de personnels adaptés est un sérieux problème auquel il faudra faire face dans une optique d'élargissement de la prise en charge et du suivi des patients à l'échelle nationale.

Malgré tous ces efforts, il ne faut pas perdre de vue que le Cameroun occupe une place essentielle non seulement dans la diversité du HIV-1, mais aussi dans celle du SIV, d'où la nécessité d'évaluer les risques d'émergence de nouvelles zoonoses dans ce pays.

C. SIV CHEZ LES PRIMATES AU CAMEROUN

Parallèlement à l'endémicité du HIV-1 au Cameroun, on observe aussi une importante diversité de lentivirus simiens chez les primates non-humains vivant naturellement dans ce pays. En effet, parmi les 20 espèces de primates vivant au Cameroun, plus d'une dizaine sont naturellement porteuses d'un SIV. C'est le cas des mandrills, des drills, des chimpanzés, des colobes guéréza, des cercocèbes à collier blanc, des singes de Brazza, des talapoins, de singes hocheurs, des moustacs et des cercopithèques mona, qui ont tous été décrits comme naturellement porteur d'un SIV au Cameroun (5, 50, 97, 98, 281, 304, 371, 384). L'identification des variants HIV-1 aussi divergents que ceux des groupes O et N a conduit à s'interroger sur la possible origine géographique du HIV-1 dans ce pays. En effet, certaines évidences sont en faveur de cette hypothèse : (i) Le SIVcpz du *Pan t. troglodytes* à l'origine du HIV-1 est retrouvé au Cameroun chez des chimpanzés en captivité et dans la nature (93, 273, 281); (ii) le HIV-1 N qui pour le moment n'a été identifié qu'au Cameroun, est phylogénétiquement très proche du SIVcpzptt particulièrement dans la région 3' (140, 366); et enfin (iii) la divergence entre les trois groupes HIV-1 M, N, et O suggère autant d'évènements de transmission inter-espèces du SIVcpz du chimpanzé à l'homme (358), et le Cameroun est le seul pays où tous ces trois groupes de virus sont réunis. Ces évidences montrent que le Cameroun, ou du moins l'ouest de l'Afrique centrale représente le point d'origine de l'infection à HIV-1. Vu la diversité des SIV circulant au Cameroun, l'endémicité du HIV-1 au Cameroun, et l'origine simienne du HIV-1, il serait logique de s'interroger sur l'éventualité de nouvelles zoonoses lentivirales dans ce pays.

D. VIANDE DE BROUSSE ET SANTE PUBLIQUE AU CAMEROUN

Comme dans la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne, la chasse, le commerce et la consommation de la viande de brousse ont toujours représenté une part importante des ressources financières des populations locales, ainsi qu'une source non-négligeable de protéine. A ce jour, certaines



Photo 19. Viande de brousse. Réalisée par les chercheurs de l'UMR-145 IRD.

populations de pygmée du Cameroun continue de vivre essentiellement de la cueillette et de la chasse. De plus le commerce de la viande de brousse n'est plus seulement destiné à améliorer les conditions de vie des chasseurs traditionnels et l'apport en protéine des populations locales, mais est devenu une activité intensive, soutenue par le braconnage et des réseaux de distribution s'étendant au delà des frontières camerounaises. Les espèces chassées et commercialisées sont diverses, mais en majorité constituées de cercopithèques. Or, une étude réalisée récemment sur la viande de brousse vendue sur les marchés camerounais, montre que la plupart des espèces de primates consommées par la population est porteuse d'un SIV, parmi lesquels la lignée SIV_{gsn/mus/mon} impliquée dans l'origine du SIV_{cpz} (304). Ces populations sont régulièrement en contact avec divers lentivirus de primates, non seulement à travers la consommation de la viande de brousse, mais aussi avec les primates de compagnie. Le dépeçage du produit de la chasse et le contact avec le sang éventuellement infecté, les morsures et griffures des animaux de compagnie, le contact avec les tissus telles que les fèces et les urines des primates sont autant d'occasions de transfert d'un lentivirus du singe à l'homme. Des études in vitro montrent que plusieurs SIV ont la capacité d'infecter et de croître dans les cellules humaines, prouvant ainsi qu'il pourrait potentiellement émerger dans la population humaine et générer de nouvelles zoonoses (153). Ce risque est amplifié par l'implantation de plus en plus importante des concessions forestières au Cameroun, qui a pour conséquence l'accès dans des zones forestières encore inaccessibles il y a quelques années et le contact des populations locales avec des nouvelles espèces de primates et de nouveaux variants de virus. De plus, la circulation au Cameroun de variants HIV-1 très divergents et assez proches des SIV tel que le groupe N, pourrait conduire à l'émergence de nouveaux variants recombinants HIV/SIV ayant la capacité de se propager dans la population humaine (304). Il est donc important de sensibiliser les autorités sanitaires et les populations locales sur les risques que représentent la chasse, la consommation de la viande de brousse et les primates de compagnie pour la santé publique, de même que la nécessité de préserver la biodiversité qu'offre la faune et la flore camerounaises.



Photo 20. Singe de compagnie. Réalisée par les chercheurs de l'UMR-145 IRD.



Photo 21. Viandes de brousse vendues dans un marché. Réalisée par les chercheurs de l'UMR-145 IRD

TRAVAUX DE THÈSE

OBJECTIF PRINCIPAL

L'émergence des zoonoses est un phénomène ancien dont l'impact pour la santé publique peut être considérable. Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) est une de ces zoonoses émergentes, dont l'origine est la transmission de deux virus simiens à l'homme; le SIVcpz du chimpanzé et le SIVsmm du mangabey enfumé, respectivement responsables des HIV-1 et HIV-2 (161). L'infection à HIV illustre clairement les dangers que représentent les zoonoses pour les populations humaines dans la mesure où plus de 40 millions de personnes sont aujourd'hui porteuses de l'infection dans le monde (292). Les avancées réalisées dans la recherche sur l'infection à HIV ont permis de documenter l'épidémiologie, la diversité génétique, la pathogénicité et le traitement, mais les virus à l'origine de la pandémie restent moins bien étudiés. De plus, il est reconnu que plusieurs événements de transmission de SIV du singe à l'homme sont à l'origine des HIV-1 et HIV-2. Cependant, bien que l'homme reste exposé à divers SIV à travers des contacts réguliers, nos connaissances actuelles sur la capacité de transmission d'autres SIV du singe à l'homme sont limitées (5). En l'absence d'un vaccin, la maîtrise et le contrôle de l'infection à HIV nécessitent la prise en charge des personnes infectées et la connaissance des mécanismes liés à l'émergence des résistances aux ARV. D'autre part, une veille sanitaire sur de nouveaux lentivirus simiens transmis à l'homme est indispensable. De tels cas de transmission doivent être rapidement identifiés afin d'éviter de nouvelles pandémies.

Les travaux de cette thèse bien que scindés en deux parties avaient pour principal objectif d'approfondir nos connaissances sur les conséquences de la diversité génétique des HIV-1 et SIV circulant au Cameroun à travers différentes études dans lesquelles nous avons:

1) Étudié la fiabilité des outils de diagnostic sérologique utilisés au Cameroun pour l'identification des variants HIV-1 circulant dans ce pays et vérifié si la diversité génétique du HIV-1 pouvait influencer l'efficacité des traitements actuellement disponibles.

2) Développé et évalué des outils de détection des SIV et étudié plus en détail la diversité des SIV chez les primates africains, particulièrement ceux auxquels les hommes sont exposés.

Partie 1: HIV

📌 OBJECTIFS

Comme mentionnée plus haut, l'infection à HIV au Cameroun revêt un caractère singulier du fait de l'exceptionnelle diversité génétique des souches HIV-1 circulant dans ce pays. L'infection en elle-même, avec une prévalence estimée à 6%, et près de 50 000 décès par an (293), représente déjà un réel problème de santé publique comme dans la majorité des pays de l'Afrique subsaharienne. Mais la particularité de la diversité génétique du HIV-1 au Cameroun rend indispensable l'élaboration des protocoles de diagnostic et de prise en charge des patients adaptés à cette situation. Les conséquences de la diversité génétique du HIV sur le diagnostic et le traitement de l'infection ne sont plus à démontrer et soulignent la nécessité d'une évaluation continue et suivie des outils de diagnostic, de prise en charge des patients, de même qu'une évaluation de l'efficacité des molécules antirétrovirales mises sur marché par rapport aux polymorphismes naturels des souches non-B prédominantes en Afrique subsaharienne et au Cameroun.

Dans la première partie de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à deux axes majeurs de la lutte contre l'infection à HIV que sont le diagnostic et le traitement.

① En évaluant les tests utilisés pour le diagnostic de l'infection à HIV au Cameroun, ce diagnostic étant essentiel à l'identification correcte des personnes infectées et permettant d'assurer la sécurité transfusionnelle. Nous avons déjà souligné le fait que la majorité des outils destinés au diagnostic de l'infection à HIV était élaborée par rapport au prototype HIV-1 sous-type B, prédominant dans les pays industrialisés. Or, les souches non-B sont prédominantes dans les pays les plus touchés par l'infection, principalement en Afrique subsaharienne (Figure 10). Les premiers tests de diagnostic sérologique ont donc très rapidement montré leurs limites à identifier correctement toutes les souches non-B, limitations illustrées par l'identification en 1990 du HIV-1 group O, indétectable par la plupart des tests courants (160, 411). Il a été aussi mis en évidence la difficulté de ces outils à identifier les personnes infectées par les souches non-B en début de séroconversion, comparativement à celles porteuses des souches B (23, 245). Ces outils de diagnostic ont subi de nombreuses améliorations afin de combler ces lacunes, d'une part par l'inclusion des antigènes spécifiques au groupe O, et d'autre part par la mise au point des tests de 4^{ème} génération capables de détecter simultanément l'antigène p24 et de réduire sensiblement la fenêtre sérologique (90, 107, 242, 349, 424). Néanmoins, ces faiblesses initiales ont démontré la nécessité d'une

vigilance constante sur la qualité des outils de diagnostic, vu la dynamique d'évolution du HIV-1 et la chronologie d'identification des différents groupes. Dans un pays comme le Cameroun, où co-circulent pratiquement tous les variants HIV-1, le risque qu'il existe dans la population des souches non encore identifiées parce que non-détectables par les tests actuels n'est pas négligeable, de plus la co-circulation de multiples variants accroît les chances d'émergence de recombinaisons dont on ne peut toujours prédire les conséquences sur le diagnostic. Et enfin, il faut noter que la majorité des tests mis sur le marché est évaluée dans les laboratoires standards du Nord et très peu dans les pays en voie de développement où les conditions de manipulation, la logistique et la qualification du personnel ne sont pas comparables. Le but de cette étude était:

↳ *D'évaluer la fiabilité des tests de diagnostic du HIV commercialisés au Cameroun, vu la forte hétérogénéité des variants HIV locaux.*

↳ *Etudier la diversité génétique de la région immunodominante de la glycoprotéine d'enveloppe (gp41), utilisée dans les tests sérologiques.*

② La prise en charge thérapeutique des personnes vivant avec le HIV/SIDA étant de plus en plus effective dans les pays en voie de développement et au Cameroun, nous avons étudié la diversité génétique des HIV circulant au Cameroun, pour la présence de mutations liées aux résistances. Les souches HIV-1 non-B présentent par rapport aux souches B de nombreuses mutations pour la plupart mineurs dans les régions cibles des ARV (Pol et Env), mais dont l'accumulation ou l'association avec d'autres mutations peuvent conduire à l'apparition des résistances. Ce polymorphisme naturel est particulièrement important dans la protéase des souches non-B (315, 414). Avec l'augmentation des traitements ARV et les limitations liées à l'apparition des résistances, les tests de résistance génotypiques sont de plus en plus recommandés pour la sélection de traitements efficaces en Europe et aux Etats-Unis (165, 356). Pour faciliter l'application de ces tests de résistance, plusieurs algorithmes ont été développés en corrélant les profils génotypiques aux données cliniques et/ou aux données phénotypiques (299). Cependant, dans la pratique l'application de ces algorithmes peut conduire à des prédictions contradictoires des réponses thérapeutiques (112, 446). En effet, ces algorithmes d'interprétation ont été principalement basés sur les résultats des patients infectés par le sous-type B. Dans la mesure où les souches B représentent une faible proportion des souches HIV-1 circulants et que la fréquence des souches non-B croît dans les pays industrialisés, il était nécessaire d'évaluer l'impact des algorithmes d'interprétation des

tests de résistance génotypique sur l'efficacité des traitements des personnes infectées par les souches non-B. Pour atteindre cet objectif, nous avons:

↳ *Comparé trois algorithmes d'interprétation différents pour leur capacité à prédire la sensibilité des souches mutantes aux AVR et le choix de traitements sur un large panel composé de patients non-B naïfs ou sous traitement.*

↳ *Etudié les mutations mineures naturellement présentes sur les souches HIV-1 non-B et susceptibles d'induire des discordances d'interprétations.*

③ L'efficacité des inhibiteurs de la RT et de la protéase, qui sont les classes d'ARV classiquement utilisées dans le traitement des patients et la prévention de la transmission mère-enfant en mono, bi et surtout trithérapie n'est plus à démontrer. Cependant, l'émergence des résistances à ces molécules, la persistance de réservoirs viraux latents, et les complications métaboliques associées au traitement sur le long terme, sont autant de limitations à l'utilisation de ces classes d'ARV (204). D'où la nécessité de développer et d'évaluer de nouvelles classes de molécules capables d'offrir une alternative. Les inhibiteurs d'entrée et de fusion sont élaborés dans ce sens et la première molécule de cette classe approuvée par le FDA et mise sur le marché est le T20 (Enfuvirtide ou Fuzeon®). Ce peptide de 36 acides aminés dérivé de la sous-unité HR2 de la glycoprotéine d'enveloppe gp41 se fixe par compétition à la sous-unité HR1 de la gp41, empêchant ainsi la fusion entre les membranes cellulaires et virales, et par conséquent l'entrée du virus dans la cellule (92, 430, 431). Malgré l'apparition de réactions cutanées liées à l'injection sous-cutanée du T20 et son coût très élevé, cette molécule a prouvé son efficacité chez les patients multi-résistants aux autres classes d'ARV (36, 218, 223). Comme la plupart des molécules antirétrovirales, le T20 a été développé sur le prototype HIV-1 sous-type B. Même si son utilisation dans les pays du sud est limitée par son coût, la proportion des souches non-B dans les pays du nord où le sous-type B est traditionnellement prédominant devient assez significative pour justifier la nécessité d'évaluer leur sensibilité à cette molécule. Les souches non-B présentent de nombreux polymorphismes comparés au sous-type B, polymorphismes capables d'influencer leur sensibilité aux inhibiteurs de la RT et de la protéase de même que la cinétique d'apparition des résistances. Le but de cette troisième étude était:

↳ *D'évaluer la sensibilité des souches non-B au T20, ceci en étudiant le polymorphisme des sous-unités de la gp41, HR1 et HR2, la première étant le site de fixation du T20 et la seconde couvrant la région d'où est dérivée la séquence du T20.*

Chapitre I

Evaluation des outils de diagnostic du HIV au Cameroun

I. Contexte de l'étude

L'épidémiologie de l'infection à HIV-1 au Cameroun est caractérisée par une importante diversité des souches circulantes (133, 160, 258, 287, 288, 366, 411, 413). L'identification correcte des personnes infectées représente une étape essentielle dans la lutte contre la pandémie et le contexte particulier de la diversité du HIV au Cameroun rend indispensable l'évaluation régulière des outils de diagnostic sérologiques.

II. Matériel et Méthodes

Nous avons constitué au courant de l'année 2001, un panel de 503 échantillons provenant de donneurs de sang se rendant dans les banques de sang de 7 différentes localités, couvrant presque tout le sud Cameroun : Yaoundé (n = 211), Douala (n = 164), Bamenda (n = 36), Bafoussam (n = 29), Bertoua (n = 25), Limbé (n = 22) et Ebolowa (n = 16) (Figure 17). Tous les échantillons étaient analysés avec quatre tests rapides; Camstix HIV 1+2 (Camdiagnostix, Yaoundé, Cameroun), Détermine HIV 1+2+O (Abbott Laboratories, Tokyo, Japan), Génie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) et ImmunoComb II HIV 1 & 2 Bispot (Orgenics, Yavne, Israel) et deux ELISA de 4^{ème} génération; Enzygnost HIV Intégral (Dade Behring, Marburg, Germany) et Genscreen plus HIV Ag-Ab (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) commercialisés au Cameroun. Les échantillons non-réactifs à tous les tests sérologiques étaient considérés comme négatifs et ceux présentant un résultat discordant confirmés avec deux tests de confirmation, INNO-LIA HIV Confirmation (Innogenetics, Gent, Belgium) et/ou HIV Blot 2.2 (Genelabs Diagnostics, Singapore Science Park, Singapore). Une PCR de la région gp41 de l'enveloppe était ensuite réalisée sur les échantillons indéterminés ou positifs afin d'une part de confirmer ou non l'infection à HIV pour les indéterminés, et d'autre part caractériser génétiquement tous les positifs. Une fois le panel correctement caractérisé par rapport au statut sérologique (négatif, positif et indéterminé), la sensibilité, la spécificité, l'efficacité et les valeurs prédictives positives et négatives étaient calculées pour les différents tests évalués (Camstix, Détermine, Génie II, ImmunoComb II, Enzygnost HIV Intégral et Genscreen Plus). Pour étudier les mutations susceptibles de réduire la sensibilité des tests sérologiques, les séquences en acide aminé de la région immunodominante étaient déduites des fragments de PCR de la gp41, et comparées à celle du prototype B [LAVERYLKDQQLLGIWGCSSGKLLIC (aa 581 – 604)].

III. Résultats

Sur un panel de 503 échantillons analysés avec 4 tests rapides et deux ELISA, 181 étaient négatifs à tous tests et ont été considérés négatifs à l'infection HIV; 280 ont été considérés positifs car ils réagissaient à tous les tests ($n = 277$) ou donnaient des résultats discordants et ont été confirmés positifs par les tests de confirmation ($n = 3$). Tous les échantillons positifs ont été testés avec un ELISA discriminant compétitif, le Wellcozyme (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), et appartenaient tous au HIV-1 group M d'après les ratios des densités optiques (DO). Les 42 échantillons restants (8,4%) présentaient des résultats discordants et n'ont pu être confirmés HIV positifs ou négatifs. Tous réagissaient au moins avec un antigène HIV des tests INNO-LIA et western blot, mais ne remplissaient pas les critères de positivité. La réalisation de PCR très sensibles (HPOL) pour l'identification des souches HIV-1 (M, N, O) et SIVcpz (134) était négative pour tous ces échantillons. D'autres PCR effectuées avec des amorces très sensibles et universelles pour l'identification de la majorité des lignées SIV et HIV ont toutes été négatives et nous avons donc considéré ces 42 échantillons comme des indéterminés.

Lors du calcul des valeurs qualitatives des différents tests (sensibilité, spécificité, efficacité et valeurs prédictives), nous avons considéré deux scénarios: le premier excluant les résultats indéterminés des analyses et couramment utilisé lors des évaluations des tests sérologiques et par l'OMS, et le second les incluant. Dans les deux cas, tous les tests évalués présentaient une assez bonne sensibilité, allant jusqu'à 100% pour deux tests rapides (Camstix et Determine) et pour les deux ELISA (Enzygnost et Genscreen). Par contre, la spécificité des tests était considérablement affectée par l'inclusion des indéterminés. En effet, en l'absence des indéterminés, à l'exception du Genscreen tous les tests avaient une assez bonne spécificité, le Genie II et l'ImmunoComb ayant les meilleurs résultats (respectivement 100% et 99,5%). L'inclusion des indéterminés avait pour conséquence directe la baisse de la spécificité de tous les tests de 2 à 14%, plus particulièrement pour le Genscreen dont la spécificité avant l'inclusion était déjà assez faible. Ainsi, l'efficacité qui dépend de la sensibilité et de la spécificité se trouvait légèrement modifiée en fonction des résultats indéterminés.

Sur le total de 280 échantillons positifs, 253 ont été amplifiés avec succès et ont permis la caractérisation génétique de notre panel. Tous les isolats appartenaient au HIV-1 groupe M avec la distribution suivante : 18 (7,1%) A1; 3 (1,18%) A2; 10 (3,95%) D; 13 (5,13%) F2; 12 (4,74%) G; 186 (73,5%) CRF02_AG; 4 (1,58%) CRF11_cpx; 3 (1,18%)

CRF06_cpx et 4 (1,58%) CRF01_AE. Nous avons noté la prédominance du CRF02_AG et la présence d'autres sous-types et CRFs correspondant aux résultats rapportés par d'autres études sur la diversité génétique du HIV au Cameroun (70, 258, 288, 385, 390, 413). La comparaison des séquences en aa de la région immunodominante de la gp41 avec celle du prototype B a mis en évidence la présence de différentes mutations mineures $V^{583} \rightarrow L$ ou I (85%); $R^{585} \rightarrow G, S, A, K$ ou F (10%); $K^{588} \rightarrow R, G, Q, M, E$ ou H (55%); $Q^{591} \rightarrow K$ ou R (3%) et $L^{592} \rightarrow I$ ou F (6%) dans l'épitope CTL (aa 581 à 593); $S^{599} \rightarrow A$ ou T (1%); $K^{601} \rightarrow R$ ou I (3%); $L^{602} \rightarrow I, R$ ou H (11%) dans la boucle cystéine (aa 598 à 604), mais nous n'avons observé aucune mutation majeure susceptible de modifier la conformation de l'épitope CTL ou de la boucle cystéine.

IV. Discussion et Conclusion

La sécurité transfusionnelle et l'identification correcte des personnes infectées par le HIV sont essentielles à toute stratégie efficace de prévention et lutte contre l'infection à HIV. La présente étude nous a permis d'évaluer les performances des différents tests sérologiques utilisés dans le diagnostic de l'infection à HIV au Cameroun. Globalement les tests évalués avaient une assez bonne efficacité avec deux tendances observées : ceux présentant une meilleure sensibilité (Camstix, Determine, Enzygnost et Genscreen) donc pouvant être utilisés en première intention, et ceux ayant une meilleure spécificité (Genie II et ImmunoComb II) et appropriés à la pré-confirmation. Cependant, ce travail a mis en évidence une importante prévalence des résultats indéterminés (8%) dans le diagnostic sérologique au Cameroun, fait déjà rapporté par des études similaires dans d'autres pays africains (402). Malgré l'utilisation du western blot, nous n'avons pu réduire ce nombre d'indéterminé, ce qui souligne son inefficacité dans ces situations et la nécessité d'élaborer des stratégies de diagnostic adaptées au contexte africain. Cette étude a aussi mis en évidence les limites des tests de 4^{ème} génération dans le diagnostic de routine. En effet, s'ils présentent une bonne sensibilité, leur spécificité est cependant moins bonne, particulièrement pour le Genscreen dont l'utilisation en routine engendrerait davantage d'indéterminés, dans des conditions où les tests de confirmation ne sont pas toujours accessibles et applicables.

L'étude des mutations susceptibles de réduire l'efficacité des tests sérologiques sur la région immunodominante de la gp41 a mis en évidence la présence de multiples substitutions silencieuses dans cette région. Cependant, nous n'avons identifié aucune mutation susceptible d'entraîner une réduction de la sensibilité aux tests de diagnostic sérologique évalués. En

effet, tous échantillons présentant les mutations mineures observées ont été correctement identifiés par tous les tests évalués.

En conclusion, comme dans la majorité des pays de l'Afrique subsaharienne très touchés par l'infection à HIV, le diagnostic est un sérieux problème de santé publique au Cameroun. La co-circulation de multiples variants souligne d'autant plus la nécessité d'élaborer des stratégies de diagnostic appropriées et de disposer d'outils fiables, et aux coûts accessibles. Les stratégies associant les tests rapides et l'ELISA peuvent être adaptées à ce contexte, car efficaces et moins coûteuses que celle impliquant le western blot. Comme précédemment montré par Makuwa et al. (245), cette étude souligne aussi la nécessité d'évaluer les outils de diagnostic dans les conditions où ils sont destinés à l'utilisation courante.

V. Publication

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (JAIDS)*.

Aghokeng, A. F., Ewane, L., Awazi, B., Nanfack, A., Delaporte, E., Peeters, M., and Zekeng, L. (2004). Evaluation of Four Simple/Rapid Assays and Two Fourth-Generation Elisa's for the Identification of HIV Infection on a Serum Panel Representing the HIV-1 Group M Genetic Diversity in Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* **37**(5):1632-1640.

Evaluation of Four Simple/Rapid Assays and Two Fourth-Generation ELISAs for the Identification of HIV Infection on a Serum Panel Representing the HIV-1 Group M Genetic Diversity in Cameroon

Avelin Fobang Aghokeng, MSc,† Léonard Ewane, BSc,* Bih Awazi, BSc,* Aubin Nanfack, BSc,* Eric Delaporte, MD, PhD,† Martine Peeters, PhD,† and Léopold Zekeng, MD**

Summary: The performance of 4 rapid and simple assays: Camstix-HIV 1+2 (Camdiagnostix, Yaoundé, Cameroon); Determine HIV 1+2+0 (Abbott Laboratories, Tokyo, Japan); Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France); ImmunoComb II HIV 1 & 2 BiSpot (Organics, Yavne, Israel); and 2 fourth-generation ELISAs: Enzygnost HIV Integral (Dade Behring, Marburg, Germany) and Genscreen plus HIV Ag-Ab (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) currently used in Cameroon to detect HIV infections were evaluated on a local serum panel. A total of 503 samples were collected, using the Camstix-HIV 1+2 assay. Overall, 280 samples were confirmed HIV positive, 181 were negative, and 42 were indeterminate. All positive samples belonged to group M: CRF02_AG (73.5%), A1 (7.1%), A2 (1.2%), G (4.7%), F2 (5.1%), D (1.6%), CRF11 (1.6%), CRF06 (1.2%), and CRF01_AE (1.6%). Sensitivity, specificity, test efficiency, and positive and negative predictive values were calculated both including and excluding indeterminate samples. Except for Genie II and ImmunoComb II (98.9 and 99.3%, respectively), sensitivities were 100% for the remaining 4 tests. Specificities, efficiencies, and positive predictive values of all assays were negatively affected by the addition of HIV-indeterminate samples in the calculations. These data show the importance of prior test evaluations on local serum panels and in field conditions before a national policy for HIV screening is decided on and stress also the need to use tests and algorithms that can reduce the high number of HIV-indeterminate results in Africa.

Key Words: HIV, anti-HIV antibody detection, simple/rapid assays, ELISA, mutations

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37:1632–1640)

Received for publication December 12, 2003; accepted April 5, 2004.
From the *Laboratoire de Santé Hygiène Mobile, Yaoundé, Cameroon; and †UMR 145, IRD, Université de Montpellier I, Montpellier, France.
Supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS), France.
Reprints: Martine Peeters, Laboratoire Retrovirus, IRD, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France (e-mail: martine.peeters@mpl.ird.fr).
Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

The HIV type 1 genome exhibits an extraordinary degree of variability mainly due to the error-prone and recombinogenic nature of the viral reverse transcriptase enzyme and the fast turnover of virions.^{1,2} The genetic characterization of many HIV isolates obtained from diverse geographic localities led to the classification of HIV-1 into 3 groups: M as major, O as outlier, and N as non-M/non-O.^{3,4} Within group M, HIV-1 is also subdivided into 9 subtypes (A–D, F–H, J, and K) and 15 circulating recombinant forms (CRFs).⁵ Group O is characterized by several heterogeneous viruses,⁶ but group N is identified in only a limited number of individuals.⁷ This genetic classification has led to increased understanding of the molecular evolution of HIV-1 and the geographic distribution and patterns of spread of HIV strains.

Cameroon and neighboring countries in Central Africa are characterized by the co-circulation of a large number of HIV variants among its population; all 3 HIV-1 groups, almost all subtypes, and at least 5 CRFs have been documented.^{8–12} Cameroon is the only African country where group M, N, and O HIV-1 strains co-circulate, and group O and N were first discovered in this country, respectively, in 1994^{3,13} and 1998.⁴ The overall HIV prevalence in the general adult population in urban areas has increased significantly from 0.5% in 1987 to 11% in 2000.¹⁴ Similarly as to urban areas, several recent studies have reported a high prevalence and genetic diversity of HIV-1 in rural Cameroon.^{11,15}

The identification of group O, group N, and intergroup M/O recombinants in Cameroon^{16–18} illustrates the necessity of a continuous monitoring of circulating HIV strains in this region.

As part of the efforts to reduce the transmission of HIV, there is a need for reliable diagnostic assays, capable of ensuring the correct identification of infected individuals and the safety of blood transfusion.¹⁹ The identification of HIV-1 group O demonstrated the weakness of certain assays to diagnose these strains and led to the development of more sensitive and specific assays, with either the inclusion of HIV group O-specific antigens or by using broadly cross-reacting HIV antigens.²⁰ In addition, it has been shown that most of the commercially available third-generation HIV antibody assays are less efficient at detecting early seroconversions in non-B-infected individuals as compared with B. The introduction of p24 antigen in HIV fourth-generation detection assays has

considerably reduced the diagnostic window.^{21,22} The availability of simple/rapid and low-cost assays is now facilitating access to diagnosis in resource-poor settings.^{23–25} Despite all these efforts, an ongoing evaluation of performance of HIV assays remains important, because genetic subtype distribution is a dynamic process. It is also important to evaluate the tests on a panel of African sera and in field conditions.

Since the majority of HIV serologic assays rely on antibody responses to the structural proteins of the virus, especially the envelope glycoprotein gp41, mutations observed in this domain, especially in the immunodominant region (IDR) composed of the CTL epitope (LAVERYLKDQQLL) and the cysteine loop (CSGKLIC), could affect the sensitivity of serologic assays.^{26,27} Many studies have reported several amino acid mutations in the gp41 domain among all subtypes of HIV-1 group M viruses, as well as group O and group N.^{28,29} The aim of our study was to evaluate selected HIV diagnostic assays currently used in Cameroon on a panel of HIV-positive and -negative sera, representing the predominant viral strains and monitor the impact of mutations within the IDR of the gp41 domain on antibodies detection.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

The strategy defined by the Cameroonian National AIDS Committee for most of the public hospitals is to screen all blood donations for the presence of HIV antibodies by a simple and rapid test, Camstix-HIV 1+2 (Camdiagnostix, Yaoundé, Cameroon), a test partially manufactured in Cameroon. To further evaluate the efficiency of other commonly used HIV screening assays, a serum panel of HIV-positive and -negative samples was constituted in 2001, among blood donors attending blood banks in 7 distinct localities: Yaoundé (Center Province) (n = 211), Douala (Littoral Province) (n = 164), Bamenda (North-West Province) (n = 36), Baffoussam (West Province) (n = 29), Bertoua (East Province) (n = 25), Limbé (South West Province) (n = 22), and Ebolowa (South Province) (n = 16). A total of 503 (306 reactive and 197 non-reactive) samples were collected, using the Camstix-HIV 1+2 assay without any discrimination in age, sex, marital status, or occupation. Samples were shipped in coolers to the Laboratoire de Santé Hygiène Mobile at Yaoundé and stored at $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ for a maximum of 5 days.

For all samples, plasma was separated, aliquoted, and stored at -20°C . Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were also isolated from the remaining blood on Ficoll gradients (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Each PBMC sample was aliquoted and stored in liquid nitrogen.

Serologic Testing and Evaluation

Plasma samples were tested with a total of 4 rapid and simple tests and 2 fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs; tests based on the simultaneous detection of antigens and antibodies). The following rapid tests were used: Camstix-HIV 1+2 (Camdiagnostix, Yaoundé, Cameroon), Determine HIV 1+2+0 (Abbott Laboratories, Tokyo, Japan), Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Marnes la

Coquette, France), and ImmunoComb II HIV 1 & 2 BiSpot (Orgenics, Yavne, Israel). Enzygnost HIV Integral (Dade Behring, Marburg, Germany) and Genscreen plus HIV Ag-Ab (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) were the 2 ELISAs evaluated. All assays were performed according to the manufacturers' protocols, and their characteristics are summarized in Table 1.

Samples nonreactive in all assays were considered as HIV negative. Samples with discordant results among the different HIV assays were further tested with a confirmation assay; Inno-Lia HIV Confirmation (Innogenetics, Gent, Belgium) or HIV Blot 2.2 (Genelabs Diagnostics, Singapore Science Park, Singapore). All samples classified as HIV positive and HIV indeterminate were further genetically characterized in gp41 and other regions of the genome, to identify subtypes and confirm presence of HIV, respectively. Samples reactive in all assays were also tested with a competitive enzyme immunoassay (EIA), Wellcozyme HIV recombinant (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) to discriminate between HIV-1 group M and O based on optical density (OD) ratios as previously described.^{30,31}

DNA Extraction, PCR, and Sequencing Reactions

Polymerase chain reactions (PCR) were performed on all samples that reacted with ≥ 1 of the HIV screening assays. Proviral DNA was extracted from uncultured PBMCs with the QIAamp Viral DNA Mini Kit Handball (QIAGEN, Courtaboeuf, France). The gp41 region of the *env* gene was amplified by nested PCR with the following primers: gp40F1 (forward) 5'-TCTTAGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGG-3' (nucleotides [nt] 7789-7816) and gp41R1 (reverse) 5'-AACGACA-AAGGTGAGTATCCCTGCCTAA-3' (nt 8347-8374) used as outer primers and gp46F2 (forward) 5'-ACAATTATTGTC-TGGTATAGTGCAACAGCA-3' (nt 7850-7879) plus gp48R2 (reverse) 5'-TCCTACTATCATTATGAATATTTTATATA-3' (nt 8265-8294) as inner primers. These primers were previously described by Yang et al^{32,33} as highly sensitive and specific for the detection of HIV type 1 groups M, N, and O and simian immunodeficiency viruses (SIV) from chimpanzees. Using these primers, a final fragment of about 460 bp spanning 40% of the gp41 region, including the IDR, was expected from as few as 1–5 copies of viral DNA.²⁹ First-round PCR was carried out in a final volume of 50 μL containing 1X GeneAMP PCR buffer II, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate, 20 pmol of each primers, 2.5 U of *AmpliTaq* DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Foster City, CA), 5 μL of the DNA extract, and finally distilled water. After initial denaturation at 94°C for 2 minutes, 35 cycles were performed at 94°C for 15 seconds, 50°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute, with a final extension step at 72°C for 5 minutes. The second round was done in a final volume of 100 μL with the same concentration of reagents excepted for *AmpliTaq* DNA polymerase 2.6 U and the first-round PCR product: 3 μL . Only 30 cycles were performed during this second round. The nested PCR products were electrophoresed in 1% agarose gels with an appropriate bp marker and visualized under ultraviolet light by ethidium bromide staining.

TABLE 1. Characteristics of the HIV Diagnostic Assays Evaluated as Described by Manufacturers

Number	Test Name	Manufacturer	Test Type	Antigen/Antibody Type	Solid Phase	Local Price (US\$)
Rapid assays						
1	Camstix-HIV 1+2	I.M.P.M/Camdiagnostix (Yaoundé, Cameroon)	Dot immunoassay	Synthetic peptides	Polystyrene comb	1.5
2	Determine HIV 1/2	Abbott Laboratories (Tokyo, Japan)	Immunochromatographic assay	Recombinant antigens and synthetic peptides	Membrane	2.5
3	Genie II HIV-1/HIV-2	Bio-rad (Marnes la Coquette, France)	Immunochromatography assay and immunoconcentration	Recombinant antigens and synthetic peptides	Membrane	4
4	ImmunoComb II HIV 1&2	Orgenics (Yavne, Israel)	Dot immunoassay	Synthetic peptides	Polystyrene comb	3.7
ELISAs						
5	Enzygnost HIV Integral	Dade Behring (Marburg, Germany)	Sandwich ELISA	Synthetic peptides, recombinant protein, and polyclonal antibodies	Microplate	4
6	Genscreen plus HIV Ag-Ab	Bio-rad (Marnes la Coquette, France)	Sandwich ELISA	Synthetic peptides, recombinant protein, and monoclonal antibodies	Microplate	3.5
Discriminatory assay						
7	Wellcozyme HIV Recombinant	Abbott murex (Abbott Park, IL)	Competitive ELISA	Recombinant protein	Microplate	3.5
Confirmation assays						
8	Inno-Lia HIV Confirmation	Innogenetics (Gent, Belgium)	Blot	Synthetic peptides and recombinant protein	Nylon	13.5
9	HIV Blot 2.2	Genelabs Diagnostics (Singapore Science Park, Singapore)	Blot	Viral proteins and synthetic peptides	Nitrocellulose strip	26.6

On HIV-positive or indeterminate samples for which gp41 could not be amplified, the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene was amplified to verify the DNA quality. When G6PDH PCRs were positive, we attempted to amplify a more conserved region of the HIV genome using the previously described diagnostic HPOL primers.³⁴ For samples that remained negative in this assay, more universal PCR primers known to amplify a large variety of HIVs and SIVs in the *pol* gene were used.^{35,36}

The amplified gp41 fragments were purified with the QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) and directly sequenced with the DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France), using an automated sequencer (373A stretch model, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Phylogenetic and Sequence Analyses

Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL W with minor manual adjustments, bearing in mind the protein sequences.³⁷ Sequences that could not be aligned unambiguously, due to length or sequence variability, were omitted from the analysis. Phylogenetic trees using the neighbor-joining method and reliability of the branching orders using the bootstrap approach were implemented with CLUSTAL W. Genetic distances were calculated with the Kimura 2-parameter method (ratio T/T = 2.0). The newly determined HIV-1 *env* sequences were aligned with the known HIV-1 sequences representing the different genetic subtypes, and

reference strains from the circulating recombinant forms (CRFs) documented in West and West Central Africa (CRF01_AE, CRF02_AG, CRF06_CPX, CRF11_CPX, and CRF13_CPX). To clearly identify whether a sequence belonged to a subgroup corresponding to a CRF within a certain subtype, phylogenetic analysis was done for each sequence individually. Then, different trees were constructed for each group of new sequences that were thought to cluster together, and finally a general tree was obtained to visualize all the results. The clustering of each new sequence was compared and should be concordant between all trees. The reference strains used were indicated in the legend of phylogenetic trees.

The amino acid (AA) sequences deduced from the fragments corresponding to the IDR were compared with the subtype B prototype sequence [= LAI prototype strain: LAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLC (AA 581–604)] to analyze the mutations that occurred in non-B HIV-1 strains from our serum panel and check whether these mutations could be associated with reduced sensitivity of anti-HIV antibody detection assays.

Analysis of the Performance of the Serologic Assays

The sensitivity, the specificity, the efficiency, and the predictive values were calculated for each test. Sensitivity was calculated as the number of HIV-positive samples detected by the assay under evaluation, divided by the total number of confirmed HIV-positive samples, multiplied by 100. Specificity

was calculated as the number of HIV-negative samples detected by the assay under evaluation, divided by the total number of confirmed HIV-negative samples, multiplied by 100. The efficiency was calculated as the number of HIV-negative and positive samples correctly detected by the test, divided by the total number of HIV-positive and negative samples detected plus the false results, multiplied by 100. The 95% CLs of the estimated sensitivities, specificities, and efficiencies were calculated using the formula: $P \pm 1.96 \sqrt{P(1-P)/n}$, where "P" is the sensitivity, the specificity, or the efficiency and "n" is the number of specimens tested. For sensitivities, specificities and efficiencies of 100%, a value corresponding to 99.9% was assigned to "P" in this equation.

The positive and negative predictive values (PPV and NPV) were determined for each assay based on the highest and the lowest estimated Cameroonian HIV prevalences at year 2000.^{38,39}

Sensitivity, specificity, test efficiency, and PPV and NPV values were calculated both including and excluding indeterminate samples. When included, the indeterminate samples were assumed to represent negative samples, and hence reactivity to represent false positives.

RESULTS

Serum Panel

A total of 503 samples, obtained from 7 different geographic localities in Cameroon, were tested with the 4 rapid and simple assays and the 2 ELISAs described above. Among the 503 samples, 181 were negative in all assays and were therefore considered as HIV-negative samples; 280 samples were considered as HIV-positive because they were reactive in all screening assays ($n = 277$), or gave discordant results in the screening assays and were further confirmed positive by an HIV confirmatory assay ($n = 3$). All positive samples were also tested with the HIV-1 competitive ELISA (Wellcozyme) and were identified as HIV group M according to the OD ratios.

Importantly, the remaining 42 samples representing 8.4% of the serum panel were considered as indeterminate because they were not reactive in all screening assays and could not be confirmed as HIV positive. All of them had antibodies to ≥ 1 HIV antigens but did not fulfill criteria of HIV positivity in Inno-Lia or Western blot. In none of these HIV-indeterminate samples could proviral HIV DNA be amplified with diagnostic HPOL PCR, known to have a high sensitivity ($>93\%$) on a large panel of HIV variants including divergent HIV-1 O, N, and SIVcpz strains.³⁴ In addition, we tested these samples also with universal HIV/SIV *pol* primers known to amplify a large variety of HIV/SIV strains. These 42 samples were then further tested by the G6PDH PCR to check the DNA quality, and only for 6 samples, DNA was degraded. In addition, all the indeterminate samples were negative in the competitive HIV screening assay previously used to discriminate between HIV-1 group O and M.

Performance of HIV Screening Assays

Samples with an indeterminate HIV serology are often reported in Africa and especially in Central Africa. However, indeterminate sera are usually excluded from calculations of

sensitivity, specificity, etc. Since our data and previous reports showed that such sera represent an important proportion of samples in Africa,^{23,25} we studied the performance of the HIV screening assays according to 2 different scenarios: one without the indeterminate sera and another where we included the HIV-indeterminate sera, which we added to the number of HIV-negative samples due to the absence of proviral HIV DNA. Tables 2A and B show the specificities, the sensitivities, the efficiencies, and the predictive values of the different assays, respectively, with and without inclusion of the HIV indeterminate samples.

Sensitivity

The sensitivity of all assays was by definition identical in both scenarios. Camstix, Determine, and the 2 ELISAs detected all HIV-positive sera with a 100% sensitivity. Genie II and ImmunoComb II did not detect 3 and 2 HIV-positive sera, respectively, resulting in sensitivities of 98.9 and 99.3%, respectively.

Specificity

We first evaluated specificity excluding the 42 indeterminate sera (a best-case analysis). Genie II showed the highest specificity of 100.0%. ImmunoComb II misidentified 1 HIV-negative sample as positive, thus reducing its specificity to 99.5%. The specificities of Camstix, Determine, and Enzygnost HIV Integral were not statistically different from that of ImmunoComb II. In contrast, the specificity of Genscreen plus HIV Ag-Ab was only 95.0%, illustrating the high number of false positives yielded by this test. Overall, Determine, Camstix, Enzygnost HIV Integral, and Genscreen plus HIV Ag-Ab identified all HIV positives, but all yielded different levels of false-positive results. Genie II did not detect 3 HIV-positive samples but did not give any false-positive results. False-negative as well as false-positive results were observed only with the ImmunoComb II assay.

The inclusion of indeterminate samples in our calculations considerably reduced the specificity of all assays (Table 2B). Indeed, the 100.0% specificity of Genie II dropped to 98.2%. The specificities of Camstix, Determine, and Enzygnost HIV Integral also dropped significantly to 88.3, 90.6, and 92.3%, respectively. The Genscreen plus HIV Ag-Ab assay was most affected by the addition of indeterminate samples, because its specificity decreased to 82.5%. This important decrease in specificity of Camstix, Determine, Enzygnost HIV Integral, and Genscreen plus HIV Ag-Ab was due to the fact that being more sensitive, they identified the majority of the indeterminate samples as HIV reactive.

Efficiency

In the first scenario, the overall assay efficiency was $>98.1\%$. The most efficient assay was Enzygnost HIV Integral, with an efficiency of 99.8%. However, as for the specificity, the efficiency of all assays decreased with the addition of indeterminate samples, especially for Camstix, Determine, Enzygnost HIV Integral, and Genscreen plus HIV Ag-Ab, whose specificities decreased significantly (Tables 2A and B).

TABLE 2A. Performance of Tests Evaluated, Without Indeterminate Samples

Test Number*	TSIC	Positive With Test	Negative With Test	True Positive	True Negative	False Positive	False Negative
Rapid assays							
1	461	283	178	280	181	3	0
2	461	283	178	280	181	3	0
3	461	277	184	280	181	0	3
4	461	278	182	280	181	1	2
ELISAs							
5	461	281	180	280	181	1	0
6	461	289	172	280	181	9	0

Test Number*	Sensitivity %	Specificity %	Efficiency %	Positive Predictive Values (%)		Negative Predictive Values (%)	
Rapid assays							
1	100.0 (99.6–100.0)	98.3 (97.1–99.5)	99.4 (98.7–100.0)	11†	7‡	11†	7
2	100.0 (99.6–100.0)	98.3 (97.1–99.5)	99.4 (98.7–100.0)	94.4	91.5	100	100
3	98.9 (98.0–99.8)	100.0 (99.6–100.0)	99.4 (98.7–100.0)	100	100	99.3	99.3
4	99.3 (98.5–100.0)	99.5 (98.9–100.0)	99.4 (98.7–100.0)	98.1	97.5	99.6	99.6
ELISAs							
5	100.0 (99.6–100.0)	99.4 (98.7–100.0)	99.8 (99.4–100.0)	98.2	97.2	100	100
6	100.0 (99.6–100.0)	95.0 (93.0–97.0)	98.1 (96.9–99.3)	85.3	78.7	100	100

*Test number as described in Table 1.

†11 and 7% are, respectively, the highest and the lowest HIV prevalences reported in Cameroon at year 2000.

‡TSIC, total samples included in the calculations.

Positive and Negative Predictive Values

Positive and negative predictive values were calculated taking into account the lowest and the highest HIV prevalence estimations in year 2000 in Cameroon.^{38,39} With the exclusion of indeterminate samples, the PPVs varied between 85.3 and

100% in a population with 11% HIV prevalence. The lowest value was obtained with Genscreen plus HIV Ag-Ab and the best PPV was seen for the Genie II assay. As expected, the higher the HIV infection prevalence in the population, the greater the probability that a person with a reactive test result is

TABLE 2B. Performance of Tests Evaluated, Including Indeterminate Samples

Test Number*	TSIC	Positive With Test	Negative With Test	True Positive	True Negative	False Positive	False Negative
Rapid assays							
1	503	306	197	280	181	26	0
2	503	301	202	280	181	21	0
3	503	281	222	280	181	4	3
4	503	284	219	280	181	6	2
ELISAs							
5	503	297	206	280	181	17	0
6	503	319	184	280	181	39	0

Test Number*	Sensitivity %	Specificity %	Efficiency %	Positive Predictive Values (%)		Negative Predictive Values (%)	
Rapid assays							
1	100.0 (99.6–100.0)	88.3 (85.5–91.1)	89.7 (87.0–92.4)	67.9	57.4	100	100
2	100.0 (99.6–100.0)	90.6 (88.0–93.1)	91.7 (89.2–94.1)	72.4	62.5	100	100
3	98.9 (98.0–99.8)	98.2 (97.0–99.4)	98.4 (97.3–99.5)	92.9	88.9	99.3	99.4
4	99.3 (98.6–100.0)	97.4 (96.0–98.8)	97.6 (96.3–98.9)	89.8	84.6	99.5	99.6
ELISAs							
5	100.0 (99.6–100.0)	92.3 (90.0–94.6)	93.2 (91.0–95.4)	76.4	67.3	100	100
6	100.0 (99.6–100.0)	82.5 (79.2–85.8)	84.5 (81.3–87.7)	59.1	47.9	100	100

*Test number as described in Table 1.

†11 and 7% are, respectively, the highest and the lowest HIV prevalences reported in Cameroon at year 2000.

‡TSIC, total samples included in the calculations.

truly infected; therefore PPVs decreased when considering the HIV prevalence of 7%.

The addition of indeterminate samples in the calculations reduced the PPVs significantly. In this scenario, PPVs varied between 59.1 and 92.9% at the HIV prevalence of 11% and between 47.9 and 88.9% at the HIV prevalence of 7%. Overall, NPVs were very high (99.3–100%) and were not affected either by the HIV prevalence or by the addition of indeterminate samples.

Genetic Characterization of the gp41 Transmembrane Region

The gp41 transmembrane region was amplified and sequenced for 253 of the 280 samples considered as HIV positive. For 7 of the remaining 27 samples, PCRs were negative because DNA was degraded, and 20 could not be amplified for unexplained reasons.

Identification of Genetic Subtypes in gp41

Phylogenetic tree analysis of all the isolates together showed that no laboratory contamination had occurred (data not shown). All isolates were of HIV-1 group M and represent the following subtypes and CRFs: 18 (7.1%) A1; 3 (1.18%) A2; 10 (3.95%) D; 13 (5.13%) F2; 12 (4.74%) G; 186 (73.5%) CRF02_AG; 4 (1.58%) CRF11_cpx; 3 (1.18%) CRF06_cpx and 4 (1.58%) CRF01_AE. Table 3 summarizes the subtype distribution in each province from which samples were collected. Although for some regions the number of samples was limited, CRF02-AG predominated in each region and represented 63–80% of the samples. Overall, 9 HIV-1 variants (subtypes or CRFs) co-circulate, and in each region, except in the south where only 15 samples were analyzed, at least 5 HIV-1 group M variants co-circulate. Compared with previously published studies on HIV-1 group M variants, our panel is representative for the strains that circulate in Cameroon.

Amino Acid Sequence Analysis

Comparison of the individual AA sequences from the IDR with the HIV-1 subtype B consensus sequence showed that 37 isolates (14.6%) were conserved in this domain while 216 sequences (85.4%) carried 1–5 AA substitutions. One AA change was found in 78 (30.8%) isolates, 2 AA changes were found in 101 (39.9%), 3 AA changes in 30 (11.9%), and 4 to 5 AA changes in 7 (2.8%) isolates. All these substitutions were minor AA substitutions with no impact on the protein active

conformation: $V^{583} \rightarrow L \text{ or } I$ (85%); $R^{585} \rightarrow G, S, A, K \text{ or } F$ (10%); $K^{588} \rightarrow R, G, Q, M, E \text{ or } H$ (55%); $Q^{591} \rightarrow K \text{ or } R$ (3%) and $L^{592} \rightarrow I \text{ or } F$ (6%) in the CTL epitope (AA 581–593), and $S^{599} \rightarrow A \text{ or } T$ (1%); $K^{601} \rightarrow R \text{ or } I$ (3%); $L^{602} \rightarrow I, R \text{ or } H$ (11%) in the cysteine loop (AA 598–604). No major AA substitution leading to conformational changes of the gp41 protein was found. Figure 1 summarizes the different AA substitutions recorded in the CTL epitope and in the cysteine loop.

Effect of AA Substitutions on Serologic Detection

All the 216 specimens with single or multiple AA substitutions were anti-HIV antibody positive with all the assays previously evaluated, except for 3 samples that were not detected by Genie II or ImmunoComb II. However, the minor AA substitutions found in the gp41 IDR of these samples were also found in the gp41 IDR of several other samples that were correctly detected as HIV positive by Genie II and ImmunoComb II. Therefore, the minor AA substitutions observed within the CTL epitope and the cysteine loop had no impact on antibody detection of HIV-1 group M-positive sera.

DISCUSSION

A high HIV genetic diversity has been reported in urban and rural areas from Cameroon in several studies.^{9,11,12,15,17,40,41} We here confirmed this high genetic variability of HIV-1 and the co-circulation in Cameroon of almost all HIV-1 group M subtypes, with the predominance of CRF02-AG-like viruses. HIV diversity in Cameroon is also characterized by the existence of 2 of the most divergent HIV-1 strains: HIV-1 group O and group N.^{4,13} The low prevalence of these variants¹² could explain their absence in our serum panel. Alternatively, the preselection of samples by Camstix assay could have biased their representation in the panel, although in that case, possible false-negative group O or group N samples not detected with Camstix would have been reactive in at least one of the other tests used. However, the distribution of group M variants is similar to that previously reported in several studies, and therefore our panel can be considered as representative of the group M variants circulating in Cameroon.

To control the further spread of HIV infection, reduction of new HIV-infected cases is one of the main objectives of the Cameroonian National AIDS Committee. The achievement of

TABLE 3. Genetic Diversity of the gp41 Region of HIV-1 Group M in Distinct Cameroonian Provinces

Provinces	HIV-1 Group M Subtypes and CRFs									Total Province
	CRF02_AG	A1	A2	G	F2	D	CRF11_cpx	CRF06_cpx	CRF01-AE	
Littoral	77 (77.8%)	5 (5.1%)	0	6 (6.1%)	5 (5.1%)	3 (3.0%)	1 (1.0%)	0	0	99
Centre	27 (64.3%)	2 (4.8%)	2 (4.8%)	2 (4.8%)	3 (7.1%)	5 (11.9%)	1 (2.4%)	2 (2.0%)	0	42
West	14 (63.6%)	2 (9.1%)	0	1 (4.5%)	4 (18.2%)	0	0	0	1 (4.5%)	22
North-West	20 (69.0%)	4 (13.8%)	0	1 (3.4%)	1 (3.4%)	1 (3.4%)	0	0	2 (6.9%)	29
South-West	16 (76.2%)	1 (4.8%)	1 (4.8%)	2 (9.5%)	0	1 (4.8%)	0	0	0	21
South	12 (80.0%)	3 (20.0%)	0	0	0	0	0	0	0	15
East	20 (80.0%)	1 (4.0%)	0	0	0	0	2 (8.0%)	1 (4.0%)	1 (4.0%)	25
Total	186 (73.5%)	18 (7.1%)	3 (1.2%)	12 (4.7%)	13 (5.1%)	10 (4.0%)	4 (1.6%)	3 (1.2%)	4 (1.6%)	253

aa position	CTL Epitope													Cysteine loop										
	581												593	598				604						
Consensus B	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	Q	Q	L	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L	I	C
CRF02-AG n = 177	—	—	165 L 5 I 1 M	1 K	9 S 5 G 4 A 1 K	1 F	—	85 R 4 Q 4 G 2 M 1 H	—	1 K	—	5 I	—	—	6 L	1 R	—	—	1 A	—	4 R 1 I	8 I 1 H	1 R	—
A n = 11	—	—	8 L	—	1 G 1 A	—	6 R 1 Q	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 I	—	—
A2 n = 1	—	—	1 I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D' n = 10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F2 n = 6	—	—	—	—	—	—	—	1 Q 1 R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G n = 6	—	—	2 L	—	—	—	—	2 Q 2 R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CRF01-AE n = 4	—	—	—	—	—	—	—	1 Q 1 E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CRF06_cpx n = 2	—	—	2 L	—	—	—	—	2 R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CRF11_cpx n = 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

FIGURE 1. Sequence variability within the gp41 immunodominant region (IDR) (aa 581 to 604) from HIV-1 group M specimens. n represents the number of isolates with mutation(s). Dashes represent conserved amino acids in all isolates, and number followed by letter represents the number of isolates with the same amino acid substitution.

this goal is directly dependent on the correct identification of infected persons (sexual partners, pregnant women) and donated blood by reliable, simple, and cost-effective diagnostic tests. Limitations in electric energy, high-standard laboratories, and trained personnel in developing countries led to the development of simple, rapid, and cost-effective diagnostic tools that combine ease of use and good performance. Camstix, Determine, Genie II, and ImmunoComb II are the 4 rapid tests mostly used in Cameroon. During this evaluation, we noted their ease of use and rapidity. Camstix and Determine showed a 100% sensitivity. In the absence of indeterminate results, specificities of the 4 assays varied between 98.3–100%, the most specific tests being Genie II and ImmunoComb II, although these latter tests showed some false-negative results, decreasing their sensitivity.

This is one of the rare independent evaluations of Camstix, because data available until now on its performances are those provided by Camdiagnostix, the structure in charge of its production in Cameroon. However, the sensitivity of the Camstix assay could be overevaluated in our study because of the preselection of the panel samples by this test. In contrast, Determine has been evaluated previously in several studies. The evaluation of Determine done by Urassa et al²⁵ in Tanzania reported a sensitivity and specificity (100 and 98.3%, respectively) similar to what we found. Two other studies carried out in Honduras/Dominican Republic and in Thailand reported a 100% sensitivity and specificity of Determine.^{42,43} The discordance in specificities obtained in these studies could be due to the difference in sample origins. Compared with Determine, Genie II and ImmunoComb II have been less extensively evaluated. Three studies reported a 100% sensitivity of Genie II and ImmunoComb II for detecting HIV-1 group M.^{24,44,45} Two of these studies reported specificities of 99.7 and 100%, respectively, for ImmunoComb II and Genie II.^{24,44} However, another study conducted in Togo in 1999 reported sensitivity of only 90.7% for Genie II.⁴⁶ Our evaluation done in Cameroon showed sensitivities of 98.9 and 99.3% and specificities of 100 and 99.5% for Genie and

ImmunoComb II, respectively. The number and the origin of samples could not explain the differences in test performances between these different studies, because all the evaluations included a high number of samples from all origins, especially from Africa. However, field conditions of evaluation could be responsible for these disparities. Indeed, the first 3 studies reporting very good results were carried out in high-standard laboratories (Centers for Disease Control, Abidjan, Ivory Coast; Institute of Human Virology, Baltimore, MD; Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium). This observation highlights the necessity of also evaluating HIV assays in field conditions. Despite all these disparities, Genie II was found to be a very specific assay in previous studies and in our evaluation, always showing a 100% specificity. It could be recommended as a second test in algorithms using 2 screening assays.

To shorten the diagnostic window between moment of infection and detection of antibodies, and to reduce the residual risk of HIV transmission by blood and blood products, fourth-generation assays combining the detection of antibodies and p24 antigens were developed.⁴⁷ Enzygnost HIV Integral and Genscreen plus HIV Ag-Ab are fourth-generation assays currently used in Cameroon. The sensitivities of both assays in this study were excellent (100%), similar to previous evaluations.⁴⁸ Other studies also reported their capacity to correctly identify HIV-1 group O and HIV-2 samples.^{49,50} While Enzygnost HIV Integral showed a good specificity (99.4%), better than that obtained with rapid assays (Camstix and Determine), Genscreen plus HIV Ag-Ab showed a relatively low value (95.0%). Weber et al⁴⁸ also reported this better specificity of Enzygnost HIV Integral compared with Genscreen plus HIV Ag-Ab (93.4 and 98.4%, respectively).

Despite their high sensitivity, the use of fourth-generation assays for routine diagnosis in developing countries will probably be limited by the need for special algorithms for the confirmation of reactive results. Confirmation strategies proposed for these assays involve 2 parts (anti-HIV part and p24 Ag part),⁴⁸ requiring the use of very expensive assays such

as Western blot assays, and HIV p24 antigen tests, which are less efficient on African samples. For these reasons, their use in developing countries should be limited to the identification of potentially HIV-infected donated blood, and even in this situation, less specific assays such as Genscreen plus HIV Ag-Ab will result in the discard of many false-positive blood donations (>50%).

More than 8% of the samples tested in this study showed final indeterminate results that should be taken into consideration during such an evaluation. Many authors generally exclude indeterminate samples from statistical analysis, thus overestimating the performances of the test evaluated. We here considered both situations, and the discussion below on test performances focused on results obtained with indeterminate samples. Addition of these samples to our calculations as negative samples (all PCR results were negative) gave less satisfactory results. Indeed, the overall specificity was considerably reduced for all assays (82.5–98.2%), especially for the more sensitive tests (Camstix, Determine, Enzygnost HIV Integral, and Genscreen plus HIV Ag-Ab). Western blot assays, which are the worldwide gold standard for HIV infection confirmation, were unable to discriminate between positive and negative samples of this indeterminate panel, demonstrating their inefficiency in these situations. This observation also shows the advantages of testing strategies for African countries based on the use of simple/rapid assays or ELISA, which are reliable as well as cost effective, rather than screening strategies using Western blot assays. To reduce the number of indeterminate results, strategies using highly sensitive, rapid tests or ELISAs as first-line tests, and very specific rapid test or ELISA as second-line tests for positive samples, should be favored. Discordant samples could be screened with a third ELISA or rapid test of different principle or different antigen preparation, as recommended by the World Health Organization.⁵¹ Fourth-generation assays with a very low specificity such as Genscreen plus HIV Ab-Ag should be avoided in routine diagnosis.

Successful identification of HIV-infected individuals is based on the correct detection of antibodies directed against the IDRs of the gp41. Many studies have reported AA substitutions in this region, capable of affecting the antibody reactivity.^{26,27,52} The analysis of the gp41 IDRs in this study showed the existence of some AA mutations in the CTL epitope and the cysteine loop, but none of the AA substitutions found had an impact on serologic detection by the 6 HIV tests evaluated. This completely agreed with results obtained by Dorn et al⁵³ in their study using Food and Drug Administration-licensed EIA kits.

The only minor AA substitution ($L^{602} \rightarrow H$) previously described in the cysteine loop by Horal et al²⁶ as capable of affecting the antibody reactivity of a single gp41 peptide-based assay was found in about 6% of the samples tested. However, all the isolates carrying this mutation were correctly identified as anti-HIV antibody positive by the 6 tests used. Whatever the case, most of the currently commercialized diagnostic assays include more than one antigenic component, including gp160, gp120, gp41, and p24 recombinant proteins or peptides only for HIV-1, and many other components for HIV-2. Consequently, minor variations of the gp41 IDRs should not

significantly affect antibody detection, since a mutation in the gp41 IDRs capable of reducing antibody reactivity will be compensated by antibody reactivity with the other antigenic components of the assay.

In conclusion, diagnosis of HIV infection is a serious public health challenge in Cameroon, as in many other developing countries. Reliable and cost-effective assays are needed in this country to prevent the transmission of the virus and initiate treatments. Appropriate diagnostic algorithms involving the ELISAs and rapid tests evaluated in this study will probably yield good results. We clearly demonstrated their good performances as well as their limitations and the low risk of antibody detection mistakes due to the variability of the IDRs of the gp41 domain. However, there is a need to develop tests that can reduce the high number of indeterminate samples in Africa, without decreasing the capacity to identify HIV-positive samples. Our data also show the importance of prior test evaluations on local serum panel and in field conditions, before deciding on a national policy and guidelines for HIV screening.

REFERENCES

1. Hu D, Dondero TJ, Gayle TD. Global and molecular epidemiology of the HIV-1. In: Wormser IGP, ed. *AIDS and Other Manifestations of HIV Infection*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998:27–40; discussion 230–221.
2. Preston BD. Reverse transcriptase fidelity and HIV-1 variation. *Science*. 1997;275:228–229.
3. Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J, et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol*. 1994;68:1581–1585.
4. Simon F, Mauclere P, Roques P, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. 1998;4:1032–1037.
5. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*. 2000;288:55–56.
6. Yamaguchi J, Vallari AS, Swanson P, et al. Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18:269–282.
7. Ayoub A, Souquieres S, Njinku B, et al. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS*. 2000;14:2623–2625.
8. Fonjungo PN, Mpoudi EN, Torimiro JN, et al. Presence of diverse human immunodeficiency virus type 1 viral variants in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16:1319–1324.
9. Mboudjeka I, Zekeng L, Takehisa J, et al. HIV type 1 genetic variability in the northern part of Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999;15:951–956.
10. Nkengasong JN, Janssens W, Heyndrickx L, et al. Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon. *AIDS*. 1994;8:1405–1412.
11. Zhong P, Burda S, Urbanski M, et al. HIV type 1 group M clades infecting subjects from rural villages in equatorial rain forests of Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;31:495–505.
12. Vergne L, Bourgeois A, Mpoudi-Ngole E, et al. Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology*. 2003;310:254–266.
13. Vanden 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.
14. UNAIDS/WHO. Epidemiological fact sheets on HIV/AIDS and sexually transmitted infections. Available at: <http://www.who.int/GlobalAtlas/PDFFactory/HIV/reportExporting.asp>. Accessed December 5, 2003.
15. Nyambi P, Zekeng L, Kenfack H, et al. HIV infection in rural villages of Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;31:506–513.
16. Takehisa J, Zekeng L, Miura T, et al. Triple HIV-1 infection with group O and Group M of different clades in a single Cameroonian AIDS patient. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997;14:81–82.

17. Takehisa J, Zekeng L, Ido E, et al. Various types of HIV mixed infections in Cameroon. *Virology*. 1998;245:1–10.
18. Takehisa J, Zekeng L, Ido E, et al. Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in Cameroon. *J Virol*. 1999;73:6810–6820.
19. UNAIDS/WHO. *Technical Update: Blood Safety and HIV*. Geneva, Switzerland: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and the World Health Organisation; 1997.
20. Best SJ, Dax EM. Assays for HIV with improved sensitivity and specificity. *Exp Opin Invest Drugs*. 1997;8:965–983.
21. Weber B, Fall EH, Berger A, et al. Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2235–2239.
22. Gurtler L, Muhlbacher A, Michl U, et al. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. *J Virol Methods*. 1998;75:27–38.
23. Aidoo S, Ampofo WK, Brandful JA, et al. Suitability of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus in Ghana, West Africa. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2572–2575.
24. Koblavi-Deme S, Maurice C, Yavo D, et al. Sensitivity and specificity of human immunodeficiency virus rapid serologic assays and testing algorithms in an antenatal clinic in Abidjan, Ivory Coast. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1808–1812.
25. Urassa W, Nozohoor S, Jaffer S, et al. Evaluation of an alternative confirmatory strategy for the diagnosis of HIV infection in Dar Es Salaam, Tanzania, based on simple rapid assays. *J Virol Methods*. 2002;100(1–2):115–120.
26. Horal P, Svennerholm B, Jeansson S, et al. Continuous epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J Virol*. 1991;65:2718–2723.
27. Oldstone MB, Tishon A, Lewicki H, et al. Mapping the anatomy of the immunodominant domain of the human immunodeficiency virus gp41 transmembrane protein: peptide conformation analysis using monoclonal antibodies and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Virol*. 1991;65:1727–1734.
28. Leitner T. Genetic subtypes of HIV-1. In: Myers G, Korber B, Foley B, et al., eds. *Human Retrovirus and AIDS: A Compilation of Nucleic Acids and Amino Acid Sequences*. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory; 1996.
29. Pieniazek D, Yang C, Lal RB. Phylogenetic analysis of gp41 envelope of HIV-1 group M, N, and O. In: Korber B, Kuiken C, Foley B, et al., eds. *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos, NM: Theoretical Biology and Biophysics Group; 1998:III-112–117.
30. Mauclere P, Loussert-Ajaka I, Diamond F, et al. Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *AIDS*. 1997;11:445–453.
31. Rehle TM, Matke P, Liomba GN, et al. Evaluation of a quantitative double ELISA strategy for confirmation and differentiation of HIV infection. *J Virol Methods*. 1997;66:203–209.
32. Yang C, Dash BC, Simon F, et al. Detection of diverse variants of human immunodeficiency virus-1 groups M, N, and O and simian immunodeficiency viruses from chimpanzees by using generic pol and env primer pairs. *J Infect Dis*. 2000;181:1791–1795.
33. Yang C, Pieniazek D, Owen SM, et al. Detection of phylogenetically diverse human immunodeficiency virus type 1 groups M and O from plasma by using highly sensitive and specific generic primers. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2581–2586.
34. Fransen K, Zhong P, De Beenhouwer H, et al. Design and evaluation of new, highly sensitive and specific primers for polymerase chain reaction detection of HIV-1 infected primary lymphocytes. *Mol Cell Probes*. 1994;8:317–322.
35. Clewley JP, Lewis JC, Brown DW, et al. A novel simian immunodeficiency virus (SIV_{dr1}) pol sequence from the drill monkey, *Mandrillus leucophaeus*. *J Virol*. 1998;72:10305–10309.
36. Courgnaud V, Pourrut X, Bibollet-Ruche F, et al. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus from guereza colobus monkeys (*Colobus guereza*) in Cameroon: a new lineage in the nonhuman primate lentivirus family. *J Virol*. 2001;75:857–866.
37. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673–4680.
38. UNAIDS. *Epidemiology fact sheet on HIV/AIDS and sexually transmitted diseases*. 2001. Available at: www.unaids.org.
39. National AIDS Control Program. Ministry of Public Health, Yaounde, Cameroon, 2001 (annual report).
40. Carr JK, Torimiro JN, Wolfe ND, et al. The AG recombinant IbNG and novel strains of group M HIV-1 are common in Cameroon. *Virology*. 2001;286:168–181.
41. Tebit DM, Zekeng L, Kaptue L, et al. Genotypic and phenotypic analysis of HIV type 1 primary isolates from western Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18:39–48.
42. Palmer CJ, Dubon JM, Koenig E, et al. Field evaluation of the Determine rapid human immunodeficiency virus diagnostic test in Honduras and the Dominican Republic. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3698–3700.
43. Arai H, Petchclai B, Khupulsup K, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 1999;37:367–370.
44. Beelaert G, Vercauteren G, Fransen K, et al. Comparative evaluation of eight commercial enzyme linked immunosorbent assays and 14 simple assays for detection of antibodies to HIV. *J Virol Methods*. 2002;105:197–206.
45. Constantine NT, Zekeng L, Sangare AK, et al. Diagnostic challenges for rapid human immunodeficiency virus assays: performance using HIV-1 group O, HIV-1 group M, and HIV-2 samples. *J Hum Virol*. 1997;1:45–51.
46. Dagnra AY, Prince David M, Gaba J, et al. [Evaluation of eight diagnostic tests for HIV infection in Lome (Togo)]. *Med Trop*. 2002;62:507–510.
47. Ly TD, Martin L, Daghfal D, et al. Seven human immunodeficiency virus (HIV) antigen-antibody combination assays: evaluation of HIV seroconversion sensitivity and subtype detection. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3122–3128.
48. Weber B, Berger A, Rabenau H, et al. Evaluation of a new combined antigen and antibody human immunodeficiency virus screening assay, VIDAS HIV DUO Ultra. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1420–1426.
49. Brust S, Duttman H, Feldner J, et al. Shortening of the diagnostic window with a new combined HIV p24 antigen and anti-HIV-1/2/O screening test. *J Virol Methods*. 2000;90:153–165.
50. Shima T, Kondo M, Saito T, et al. [Evaluation of an HIV screening assay kit for the combined detection of anti-HIV-1/2 antibodies and HIV p24 antigen]. *Kansenshogaku Zasshi*. 2001;75:1014–1024.
51. World Health Organisation. Revised recommendations for the selection and use of HIV antibody tests. *Wkly Epidemiol Rec*. 1997;12:83–86.
52. Xu JY, Gorny MK, Palker T, et al. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J Virol*. 1991;65:4832–4838.
53. Dorn J, Masciotra S, Yang C, et al. Analysis of genetic variability within the immunodominant epitopes of envelope gp41 from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M and its impact on HIV-1 antibody detection. *J Clin Microbiol*. 2000;38:773–780.

Chapitre II

Diversité génétique et résistances primaires au Cameroun

A. POLYMORPHISME DES SOUCHES NON-B ET APPLICATION DES ALGORITHMES D'INTERPRETATION DE RESISTANCES GENOTYPIQUES AUX ARV

I. Contexte de l'étude

La diversité génétique des souches HIV-1 circulant en Afrique subsaharienne a des conséquences sur la prise en charge des patients dans ces régions, dans la mesure où la majorité des outils de prise en charge et des molécules antirétrovirales est évaluée par rapport aux souches HIV-1 B. L'introduction des ARV en Afrique est de plus en plus importante et des tests génotypiques des résistances sont aussi favorisés (356). Des algorithmes d'interprétation des mutations identifiées par ces tests génotypiques ont été élaborés et calibrés pour la plupart sur les résultats obtenus des souches B (299) . Il est donc indispensable d'évaluer l'application de ces algorithmes sur les souches non-B qui sont prédominantes dans la pandémie mondiale et déterminer les facteurs pouvant interférer avec l'utilisation de ces outils.

II. Matériel et Méthodes

428 échantillons de sang total ont été collectés chez des patients HIV positifs, dont 306 de patients africains dans différents hôpitaux au Cameroun (n = 147), Sénégal (n = 91), République démocratique du Congo (RDC) (n = 38) et Gabon (n = 30). Les 122 autres patients (46 africains et 76 Européens) ont été recrutés à l'hôpital universitaire de Montpellier, France. 272 étaient naïfs de tout traitement ARV et 156 étaient sous traitement, dont 29 sous INRT (18,6%), 16 sous INNRT (10,2%), 49 sous INRT + IP (31,4%), 20 sous INRT + INNRT (12,8%) et 26 sous IP + INRT + INNRT (16,7%). Le traitement exact restant inconnu pour 16 patients (10,3%).

L'ARN ou l'ADN était extrait du plasma ou des PBMC respectivement. Après transcription de l'ARN en ADNc, un fragment *pol* couvrant la protéase (99 aa) et la RT (310 aa) était amplifié et directement séquencé. Les nouvelles séquences étaient alignées avec les séquences de référence de différents sous-types et des arbres phylogénétiques étaient construits avec Clustal W (340) pour déterminer le sous-type. Des bootscan et courbes de diversité étaient réalisés avec le logiciel Simplot pour rechercher et différencier les variants recombinants et les CRFs (234).

Les séquences en acide aminé Pol ont été déduites des séquences nucléiques et comparées à la consensus du sous-type B de la base de données des séquences HIV de Los

Alamos (236). La sensibilité aux différentes classes d'ARV (IP, INRT et INNRT) a été prédite en utilisant trois algorithmes différents : Rega 5.5 (2002), l'algorithme de Stanford (HIVDB) (2003.08) et celui de l'Agence Nationale de recherche sur le SIDA (ANRS 2002.3) tous disponibles sur le site web de Stanford en 2003 (329, 357, 408). Afin de disposer de résultats comparables pour les trois algorithmes, nous avons défini une nomenclature commune pour chaque niveau de sensibilité (sensible, intermédiaire et résistant). Pour qu'un résultat soit concordant, il devait être identique pour les trois algorithmes et un seul résultat différent pour l'un des algorithmes entraînait la discordance. De plus, nous avons aussi analysé les discordances en considérant uniquement deux systèmes d'interprétation où le niveau intermédiaire était alternativement considéré comme sensible ou résistant.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel *SAS package* v8. Une One-Way ANOVA avec des intervalles de confiance de Tukey a été utilisée pour déterminer si le nombre de discordance était ARV-dépendant ou sous-type-dépendant, ou les deux. La fréquence des mutations a été comparée avec le test de Fisher.

III. Résultats

Dans l'ensemble, à l'exception des échantillons de patients européens majoritairement composés de souches B, les échantillons collectés étaient représentatifs de la diversité génétique du HIV-1 en Afrique centrale et en Afrique de l'ouest, avec une prédominance du CRF02_AG (42,5%), la présence des sous-types A (8,8%), G (6,1%), F (4,9%), D (5,6%), C (4,6%), J (1,2%), et K (0,4%); CRF11_cpx (3,2%), CRF01_AE (2,3%), CRF13_cpx (1,6%), CRF06_cpx (1,4%) et CRF05_DF (0,8%).

Comparaison des trois algorithmes d'interprétation chez les patients naïfs de traitements. Des discordances entre les trois algorithmes d'interprétation ont été observées dans ce groupe en fonction de plusieurs paramètres. Tout d'abord, la proportion des séquences ayant des interprétations discordantes était plus importante pour les IP comparé aux IRT. D'autre part, entre les différents IP, des différences dans la proportion des discordances étaient observées, par exemple 39% de discordance pour ritonavir et indinavir et seulement 0,6% pour lopinavir. Des différences étaient aussi observées en fonction du sous-type. Comparés au sous-type B, A et F montraient plus souvent des discordances. En ramenant le système d'interprétation de trois à deux, nous avons observé des différences dans les profils de discordance. En effet, lorsque les intermédiaires étaient considérés comme sensibles, une

très bonne corrélation était observée entre les trois algorithmes pour les IP. Lorsque les intermédiaires étaient considérés résistants, le même niveau de discordance que celui observé pour les trois systèmes était obtenu, indiquant que la discordance était associée pour les IP dans le groupe de patients naïfs, à la distinction entre sensible et intermédiaire.

Pour les IRT, la discordance entre les algorithmes était globalement faible, mais était néanmoins plus importante pour les INNRT (2,2% - 4%) comparés aux INRT (0% - 1,8%). Cependant, entre les IRT les discordances étaient significatives. La névirapine présentait plus de discordance (4%) que les autres IRT. Aucune discordance n'a été observée entre lamivudine et la didanosine. Pour tous les IRT, peu de discordance était observée en fonction du sous-type, à l'exception de zalcitabine pour laquelle des discordances étaient observées entre CRF11 et sous-type B. Comme pour les IP, l'utilisation d'un système à deux cas (sensible et résistant uniquement) a montré que la distinction entre sensible et intermédiaire était associée aux discordances pour la majorité des IRT.

Comparaison des trois algorithmes d'interprétation chez les patients sous traitement ARV. Contrairement aux patients naïfs, la proportion des discordances entre algorithmes était plus importante pour les IRT (5% - 48%) par rapport aux IP (10% - 31%) chez les patients sous traitement. Pour les IP, les différences étaient aussi observées en fonction des ARV (31% des souches discordantes pour ritonavir, 27% pour Indinavir, 25% pour lopinavir) et en fonction du sous-type (plus de discordance avec le sous-type F comparé au B). La distinction entre sensible et intermédiaire était associée à une hausse de discordances, bien que moins importante que dans le groupe de patients naïfs, et la distinction entre intermédiaire et résistant contribuait aussi à la discordance globale chez les patients sous traitement.

Contrairement au groupe de patients naïfs, les proportions des discordances obtenues étaient plus faibles pour les INNRT (5% - 8,3%) par rapport à celles des INRT (6% - 48%) chez les patients traités. Pour certaines molécules, des discordances étaient observées entre sous-types (plus de discordances pour le CRF06 comparé au sous-type B pour névirapine et éfavirenz) et pour d'autres molécules aucune discordance n'était observée en fonction du sous-type (pas de discordances entre sous-types pour zidovudine, stavudine et delavirdine). Les résultats des analyses à deux systèmes ont montré que les discordances observées étaient liées aussi bien à la distinction entre sensible et intermédiaire qu'à celle entre intermédiaire et résistant pour les IRT dans ce groupe de patients.

Fréquence des mutations et contributions à l'interprétation des résistances génotypiques aux ARV. Pour une molécule particulière, nous avons constaté que certaines souches non-B présentaient plus de discordances d'interprétation par rapport au sous-type B. Nous avons donc voulu rechercher les mutations naturellement présentes sur les sous-types non-B et susceptibles d'influencer l'interprétation des résistances génotypiques aux ARV. Afin d'éviter les biais dus aux différences entre les protocoles de traitement, nous avons limité cette investigation aux patients naïfs.

Comparé au sous-type B, la mutation majeure M46L était plus fréquente pour les souches CRF13. Des mutations mineures en position 10, 20, 36, 63, 77 et 93 de la protéase étaient considérablement plus observées dans les sous-types A (L10I, M36I), C (K20R, M36I, I93L), D (M36I), F (L10V, K20R), M36I), G (K20I, M36I), J (M36I, L63T), CRF01 (M36I), CRF02 (K20I, M36I, I93L), CRF05 (L10V), CRF06 (K20I, M36I), CRF11 (L10I, L63T), CRF13 (K20I/L, M36I, L63S, V77I). La majorité des souches non-B (A, C, F, G, J, CRF05, CRF11 et CRF13) arborait un nombre relativement important de mutations mineures aux IP comparé au sous-type B. La mutation L63P était moins prévalente dans les sous-types A, CRF02 et CRF11 par rapport au sous-type B. La V77I étaient aussi moins prévalentes pour les sous-types A, F, G et CRF02.

Aux positions liées aux résistances, les séquences RT des souches non-B et B présentaient peu de différences. Seules la V118I et la V179I étaient significativement plus prévalente dans les sous-types D et A respectivement.

Indépendamment du sous-type, des mutations uniques entraînant des scores différents en fonction des algorithmes ont été identifiées et pourraient être responsables de certaines discordances observées [par exemple dans la protéase: M46I/L (1,8%), L90M (0,4%); et dans la RT: A98G (0,3%), K101Q (0,3%), V106I (1,9%), V108I (0,75%), V178D/I (4,9%) et F227L (0,3%)]

IV. Discussion et Conclusion

Les algorithmes d'interprétation sont pour la plupart dérivés des expérimentations réalisées *in-vivo* et *in-vitro* sur les souches B. Des études précédentes ont montré que des discordances d'interprétation étaient déjà observées pour le sous-type B. Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'ampleur de ces discordances d'interprétation pour les souches non-B entre les trois algorithmes. Chez les patients naïfs de traitement, les discordances les plus importantes ont été observées dans la protéase et sont majoritairement dues au nombre

important de mutations mineures observées dans cette région. Certains algorithmes considérant la combinaison de ces mutations comme induisant une résistance intermédiaire, cela contribue à accroître les discordances. Chez les patients naïfs, nous avons aussi constaté que la classification des intermédiaires dans les groupes sensibles réduisait significativement le degré de discordance entre les algorithmes, des données cliniques sur l'implication des résistances intermédiaires chez les souches non-B sont donc nécessaires pour clarifier ces observations. Nous avons observé pour les souches non-B plusieurs mutations à des positions de résistance majeure ou intermédiaire aux INNRT (98, 101, 106, 108 et 179) et des discordances d'interprétation par chacun des algorithmes. Il est donc nécessaire d'élucider l'impact exact de ces mutations sur la sensibilités des INNRT.

Dans le groupe de patients traités, nous avons observé plus de discordances que dans celui des naïfs principalement liées à l'interprétation des mutations mineures naturellement présentes sur les variants non-B. Pour les IRT, les discordances d'interprétation étaient principalement liées à l'interprétation des mutations complexes, spécialement celles liées aux résistances croisées et aux interactions antagonistes.

En conclusion, malgré la mise à jour régulière des différents algorithmes d'interprétation, très peu de modifications ont été apportées depuis l'année 2003, date de réalisation de cette étude, donc nos données sont encore d'actualité. Dans cette étude, nous avons mis en évidence des discordances entre les trois algorithmes lorsqu'ils sont appliqués aux souches non-B naïves ou traitées, la plupart de ces discordances étant due au polymorphisme naturel des souches non-B. Il est donc nécessaire d'utiliser ces algorithmes de façon complémentaire pour une meilleure prise en charge des patients. De plus, des études sur l'implication réelle de ces mutations mineures des souches non-B sur l'apparition des résistances sont nécessaires, ainsi que des études sur la corrélation entre phénotype et génotype qui pourront aider à améliorer les algorithmes d'interprétation.

V. Publication

Un article présentant ces résultats a été publié dans *FEMS Immunology*.

Vergne L, Snoeck J, **Aghokeng A**, Maes B, Valea D, Delaporte E, Vandamme AM, Peeters M, Van Laethem K. 2006. Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naive and treated patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**(1): 53-62.

Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naive and treated patients

Laurence Vergne¹, Joke Snoeck², Avelin Aghokeng¹, Bart Maes², Diane Valea¹, Eric Delaporte¹, Anne-Mieke Vandamme², Martine Peeters¹ & Kristel Van Laethem^{2,3}

¹UMR145/UR36, IRD, University of Montpellier, Montpellier, France; ²Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium; and ³AIDS Reference Laboratory, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium

Correspondence: Kristel Van Laethem, AIDS Reference Laboratory, Minderbroedersstraat 10, B-3000 Leuven, Belgium. Tel.: +32 16 332177; fax: +32 16 332131; e-mail: kristel.vanlaethem@uz.kuleuven.ac.be

Received 13 May 2005; revised 17 June 2005; accepted 20 June 2005.

First published online 14 September 2005.

doi:10.1111/j.1574-695X.2005.00011.x.

Editor: Jennelle Kyd

Keywords

genotypic resistance; HIV; interalgorithm interpretation discordances; non-B subtypes.

Abstract

Genotypic drug resistance interpretation algorithms have been developed on patients infected with HIV-1 subtype B to interpret complex patterns of mutations. As non-B strains are characterised by the natural presence of several resistance-related mutations, we examined to what extent this might result in interalgorithm discordances in naive and treated patients. We compared the prediction by three algorithms (ANRS, Stanford and Rega) of drug susceptibilities to diverse HIV-1 strains from 272 naive and 156 treated patients. In naive patients, higher levels of interalgorithm discordance were observed for predictions of protease inhibitor (0.60–39%) than for predictions of reverse transcriptase inhibitor susceptibility (0–4%). The main reason for discordant protease inhibitor interpretation was the presence of resistance mutations that were natural protease polymorphisms. In contrast, in the treated patients, more interalgorithm discordances were observed for predictions of reverse transcriptase inhibitor (5–48%) than protease inhibitor susceptibilities (10–31%). Discordances were related to disagreement between the intermediate and susceptible scores, the intermediate and resistant scores and the interpretations of complex mutation patterns, related to cross-resistance and antagonistic interactions.

Introduction

International guidelines have recommended HIV drug resistance testing for the selection of optimal antiretroviral (ARV) therapy (Hirsch *et al.*, 2003) and resistance testing is now available as a routine tool for the care and management of HIV disease (Shafer, 2002). Genotypic resistance tests are more commonly used than phenotypic tests because of their easier implementation, lower cost and shorter turnaround time. However, genotypic mutation patterns, especially those related to cross-resistance and antagonistic interactions, require expert interpretation for a meaningful application in a clinical context. Several rules-based algorithms have been developed by correlating genotypic patterns with clinical data and/or by combining genotypic with phenotypic data and most of them are accessible through the web (Parkin *et al.*, 2002), but they can produce conflicting predictions of the therapeutic response (De Luca *et al.*, 2003; Sturmer *et al.*, 2003; Zazzi *et al.*, 2004; Ravela *et al.*, 2003).

Phylogenetic analyses revealed that HIV-1 can be divided into three groups: M (Major), N (New) and O (Outlier). Group M, which accounts for most infections worldwide, is further subdivided into nine subtypes (A–D, F–H, J–K) and 16 Circulating Recombinant Forms (CRF01–16) (Robertson *et al.*, 2000). Subtype B isolates predominate in North America and Europe, but represent only a limited proportion of infections worldwide (Peeters *et al.*, 2003). Nonetheless, genotypic drug resistance interpretation algorithms have been based mainly on results obtained from subtype B-infected patients. However, minor mutations occur as natural variants in non-B strains (Pieniazek *et al.*, 2000; Vergne *et al.*, 2000; Kantor & Katzenstein, 2003), and certain subtypes can select specific mutations under drug pressure (Gomes *et al.*, 2002; Loemba *et al.*, 2002; Brenner *et al.*, 2003; Grossman *et al.*, 2004). Antiretroviral drugs have now been introduced in developing countries where non-B variants predominate. The frequency of non-B isolates is also increasing in industrialized countries. It is thus necessary to

study to what extent the different genotypic drug resistance interpretation algorithms can predict treatment efficiency in patients infected with a non-B HIV-1 strain. We therefore compared three different algorithms for a large number of non-B treatment-naïve and treated patients to examine the influence of pre-existing polymorphisms on predictions of drug susceptibilities and the subsequent choice of therapy.

Materials and methods

Patients

Samples from 428 HIV-1-infected patients were studied: 306 Africans attending hospitals in Cameroon ($n = 147$), Senegal ($n = 91$), Democratic Republic of Congo (DRC) ($n = 38$) and Gabon ($n = 30$); and 122 patients (46 Africans and 76 Europeans) attending the University Hospital in Montpellier, France (Vergne *et al.*, 2002, 2003). Of these 428 patients, 272 were antiretroviral (ARV) drug-naïve and 156 were treated. Patients received different combinations of ARV drugs: nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) only ($n = 29$; 18.6%), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) only ($n = 16$; 10.2%), NRTI+protease inhibitor (PI) ($n = 49$; 31.4%), NRTI+NNRTI ($n = 20$; 12.8%), PI+NRTI+NNRTI ($n = 26$; 16.7%). The exact treatment regimen was unknown for 10.3% of the treated patients.

Sequences

Viral RNA or proviral DNA was extracted from plasma or peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using the QIAamp Viral RNA kit or the QIAamp Blood and Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), respectively. RNA was transcribed into cDNA with the reverse primer IN3. DNA or cDNA was amplified by a nested PCR using the Expand High Fidelity PCR system (Roche, Meylan, France) with outer primers G25REV and IN3 and inner primers AV150 and polM4 (5'-CTATTAGCTGCCCCATCTACATA-3') (Vandamme *et al.*, 1998; Vergne *et al.*, 2000). The amplified fragments, encompassing protease (99 amino acids) and RT (310 amino acids), were purified with a QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) and directly sequenced using a BigDye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

Phylogenetic analyses

Genetic subtypes were determined by phylogenetic tree analysis. The new nucleotide sequences and sequences from reference strains representing the different genetic subtypes were aligned with the CLUSTAL W program, using the protein sequences as a guide (Los Alamos National Laboratory, 2003). Phylogenetic trees were constructed with the neigh-

bor-joining method and the reliability of branching orders obtained with the bootstrap approach was implemented by CLUSTAL W (Saitou & Nei, 1987). The *pol* sequences were further investigated by bootscan and similarity analyses using SIMPLOT software to determine whether they were recombinant or classified into a known CRF (CRF01-CRF15) (Ray, 2003).

Genotypic drug resistance interpretation algorithms

Amino acid sequences were analysed for mutations associated with a reduced susceptibility to antiretroviral drugs by comparing the new *pol* sequences to a subtype B consensus sequence derived from an alignment of subtype B sequences maintained at the Los Alamos HIV Sequence Database (Los Alamos National Laboratory, 2003).

Drug susceptibilities and treatment efficiencies to PIs, NRTIs, and NNRTIs were predicted using three different algorithms: Rega 5.5 (2002), Stanford database algorithm (HIVDB) (2003.08), and French national guidelines (ANRS 2002.3), implemented at the Stanford website in 2003 (Van Laethem *et al.*, 2002; Shafer, 2003; Rhee *et al.*, 2003). Each algorithm reports its results differently. For the ANRS and Rega algorithms, viruses are scored on three levels of resistance: susceptible (S), intermediate resistant (I) and resistant (R). The HIVDB algorithm defines five levels of drug resistance: susceptible, potential low-level resistance, low-level resistance, intermediate resistance and high-level resistance. In this study a normalized comparison was established ('SIR option'). Susceptible and potential low-level resistance were considered to be susceptible (S), low-level resistance to be intermediate resistant (I) and intermediate resistance and high-level resistance to be resistant (R). Interpretations were considered concordant for a particular drug when the three algorithms assigned the same level of resistance (S, I or R) to a given sequence. Interpretations were considered discordant for a particular drug when at least one of the three algorithms assigned a different level of resistance (all possible combinations of SSI, SSR, IIS, IIR, RRS, RRI and SIR). In addition, we analysed the interpretation discordances using a two-level system where the intermediate resistance level alternatively was considered susceptible or resistant (all possible combinations of SSR and SRR).

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using the SAS software package version 8. One-way ANOVA with Tukey confidence intervals was used to determine whether the number of discordances was drug-dependent or subtype-dependent, or both. Frequencies of mutations were compared using Fisher's exact test.

Results

Phylogenetic analyses of the protease and RT sequences

In the treatment-naive population, the 272 samples represented the following HIV-1 variants in decreasing order of importance: CRF02_AG ($n = 122$, 44.9%), A ($n = 24$, 8.8%), G ($n = 23$, 8.5%), B ($n = 21$, 7.7%), F ($n = 17$, 6.2%), D ($n = 16$, 5.9%), C ($n = 14$, 5.1%), CRF11_cpx ($n = 10$, 3.7%), CRF01_AE ($n = 8$, 2.9%), CRF06_cpx ($n = 5$, 1.8%), CRF13_cpx ($n = 5$, 1.8%), J ($n = 4$, 1.5%), CRF05_DF ($n = 2$, 0.8%) and K ($n = 1$, 0.4%). In the treated population, the 156 samples were: CRF02_AG ($n = 60$, 38.5%), B ($n = 50$, 32.1%), A ($n = 14$, 9.0%), D ($n = 8$, 5.1%), C ($n = 6$, 3.8%), F ($n = 4$, 2.6%), CRF11_cpx ($n = 4$, 2.6%), G ($n = 3$, 1.9%), CRF01_AE ($n = 2$, 1.3%), CRF13_cpx ($n = 2$, 1.3%), H ($n = 1$, 0.6%), J ($n = 1$, 0.6%) and CRF06_cpx ($n = 1$, 0.6%). More than 83% of the strains were non-B HIV-1 variants; all subtypes and five CRFs were represented. Subtype B was more frequent in the treated population, and was mainly from highly treated patients in France. Overall, CRF02_AG isolates predominated (42.5%) and the population studied represents the HIV-1 variants that circulate in West and West Central Africa.

Genotypic drug resistance interpretation of patient sequences by three algorithms

The results of the analysis of patient amino acid sequences with three different interpretation algorithms are presented in Table 1. The majority of sequences from treatment-naive patients were interpreted as susceptible by all algorithms. Rega 5.5 scored more sequences as intermediate resistant towards PIs, whereas hardly any sequence was scored intermediate resistant by ANRS. In the treated patient population, the majority of sequences were still scored as susceptible. However, the number of intermediate resistant and resistant scores increased for all algorithms. Again, Rega 5.5 more frequently scored intermediate resistant for PIs, and also for RTIs. For 37.8% of the patients failing therapy, no resistance-associated mutations were detected. A more detailed analysis of their clinical history revealed that this was mainly due to poor observance or interruption of ARV treatment due to major side effects or financial constraints.

Comparison of three genotypic drug resistance interpretation algorithms in ARV treatment-naive patients

Subsequently, the interalgorithm discordances were investigated more in detail (Tables 2 and 3). The proportion of sequences displaying discordant interpretations was higher

for the PI (0.6–39%) than for the RTI susceptibility scores (0–4%). For PIs, 39% of the sequences were discordant for ritonavir, 38% for indinavir, 19% for nelfinavir, 12% for amprenavir, 12% for saquinavir, and only 0.6% for lopinavir (Table 2). In an overall PI drug comparison the differences were significant ($P < 0.0001$). Lopinavir displayed significantly less discordance, whereas ritonavir and indinavir displayed significantly higher discordance in a pairwise comparison with the other PIs. For ritonavir and indinavir, subtypes A and F displayed significantly more discordance than B. For amprenavir, subtype F and for saquinavir, F, K and CRF05 displayed significantly more discordance than B. As only a limited number of sequences were available for subtypes K (one strain) and CRF05 (two strains), care should be taken not to overvalue the results of the analysis of these subtypes. When the intermediate score was assigned to the susceptible score, the discordances decreased for PIs and the three tested algorithms had a very good agreement on PIs. Only subtype CRF13 still displayed significantly more discordance than subtype B for ritonavir and indinavir. When the intermediate level was considered resistant, similar results as in the three-level comparison were obtained, involving the same subtypes. This indicates that the main problem was associated with the distinction between intermediate and susceptible.

For RTIs, interalgorithm discordances were low overall, but were higher for NNRTIs (2.2–4%) than for NRTIs (0–1.8%) (Table 3). In an overall RTI drug comparison the discordances were significant ($P < 0.0001$). Nevirapine displayed a significantly higher level of discordance (4%) than the other RTIs in a pairwise analysis. No discordances were observed for lamivudine and didanosine. For all of the RTIs, except zalcitabine, the proportion of discordances did not differ significantly between the subtypes. Only CRF11 revealed significantly higher levels of discordances for zalcitabine than subtype B. The subanalysis, with only two susceptibility scores, showed that for most tested RTIs, except zidovudine, nevirapine and delavirdine, the discordances were related to interalgorithm disagreement between the intermediate and susceptible scores.

Comparison of three genotypic drug resistance interpretation algorithms in ARV-treated patients

In contrast to the treatment-naive patient population, the proportion of interalgorithm discordances for treated patients displayed a bigger range for the RTI (5–48%) than for the PI susceptibility scores (10–31%). For PIs, 31% of the strains were discordant for ritonavir, 27% for indinavir, 22% for nelfinavir, 20% for amprenavir, 10% for saquinavir and 25% for lopinavir (Table 4). Differences were significant

Table 1. Genotypic drug resistance interpretation of protease and reverse transcriptase sequences obtained from treatment-naïve and treated patients

	ANRS 2002.3			Stanford HIVDB 2003.08			Rega 5.5 2002		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>Treatment-naïve</i>									
PI									
Amprenavir	272			266	6		245	27	
Indinavir	267	1	4	267	5		172	96	4
Lopinavir	272			270	2		272		
Nelfinavir	271		1	266	3	6	220	51	1
Ritonavir	272			267	5		172	96	4
Saquinavir	271		1	271		1	242	30	
RTI									
Lamivudine	272			272			272		
Abacavir	272			269	3		272		
Zidovudine	272			267	2	3	269	2	1
Stavudine	271		1	268	3	1	271		1
Zalcitabine	272			271	1		272		
Didanosine	272			272			272		
Tenofovir	272			269	3		272		
Delavirdine	268		4	266	2	4	259	2	11
Efavirenz	270		2	268	2	2	265	5	2
Nevirapine	270		2	267	3	2	261	2	9
<i>Treated</i>									
PI									
Amprenavir	138		18	116	8	32	110	24	22
Indinavir	116	3	37	117	4	35	80	36	40
Lopinavir	141	15		117	13	26	136	15	5
Nelfinavir	115	5	36	111	2	43	87	28	41
Ritonavir	122	6	28	117	4	35	80	36	40
Saquinavir	120	1	35	118	2	36	107	13	36
RTI									
Lamivudine	101	2	53	95	5	56	90	16	50
Abacavir	114	28	14	68	26	62	78	41	37
Zidovudine	90		66	84	6	66	86	7	63
Stavudine	93		63	86	11	59	102	16	38
Zalcitabine	137	2	17	73	34	49	86	46	24
Didanosine	107	2	47	73	37	46	88	54	14
Tenofovir	109	4	43	92	12	52	107	41	8
Delavirdine	123		33	124	4	28	115	4	37
Efavirenz	118		38	118	4	34	116	11	29
Nevirapine	118		38	118	1	37	111	2	43

PI, protease inhibitors; RTI, reverse transcriptase inhibitors; S, number of sequences that were interpreted as susceptible (S) by the respective algorithm for a particular drug; I, number of sequences that were interpreted as intermediate resistant (I) by the respective algorithm for a particular drug; R, number of sequences that were interpreted as resistant (R) by the respective algorithm for a particular drug.

when an overall PI drug comparison was performed ($P < 0.001$). Saquinavir displayed a significantly lower level of discordance when compared to ritonavir, indinavir and lopinavir in a pairwise analysis but not when compared to nelfinavir and amprenavir. For indinavir and amprenavir, subtype F displayed significantly higher levels of discordances than subtype B. For saquinavir, this was subtypes D, F and H. When the intermediate score was assigned to the susceptible score, the proportions of discordances in the treatment group decreased, though not as significantly as for the treatment-naïve samples. These subanalyses showed that

the main problem was still associated with the distinction between intermediate resistant and susceptible, but that the disagreement on intermediate resistant and resistant also made a substantial contribution to the overall level of discordances, especially for amprenavir and lopinavir. Subtype H and subtypes G and CRF13 displayed significantly higher levels of discordances than B in the I = S subanalysis for nelfinavir and saquinavir scores, respectively. As only a limited number of sequences were included in the analysis of subtypes H, G and CRF13, the results regarding these subtypes should be interpreted with care.

Table 2. Interalgorithm discordances (%) between genotypic drug resistance interpretations of protease sequences obtained from treatment-naive patients infected with B and non-B HIV-1 subtypes

PI	Total analysis including 3 susceptibility scores (S, I, R)		Subanalysis including 2 susceptibility scores (S, R)			
	Discordances (%) ^{*,†}	Subtypes ^{‡,§}	I score assigned to S score (I = S)		I score assigned to R score (I = R)	
			Discordances (%) [†]	Subtypes ^{‡,§}	Discordances (%) ^{*,†}	Subtypes ^{‡,§}
Ritonavir	39	+ (A, F)	1.5	+ (CRF13)	37	+ (A, F)
Indinavir	38	+ (A, F)	1.5	+ (CRF13)	36	+ (A, F)
Nelfinavir	19	+	0.70	–	19	+
Amprenavir	12	+ (F)	0	–	12	+ (F)
Saquinavir	12	+ (F, K, CRF05)	0.40	–	11	+ (F, K, CRF05)
Lopinavir	<i>0.60</i>	–	0	–	<i>0.70</i>	–

*Proportions of sequences that displayed discordances were significantly different when performing an overall drug comparison ($P < 0.0001$).
[†]Proportions of discordances that did not differ significantly from each other in a pairwise analysis are displayed in an identical font style (bold, regular or italic).
[‡]+, indicates that the proportion of discordances differed significantly between all subtypes for a respective drug ($P < 0.05$); –, indicates that the proportion of discordances did not differ significantly between all subtypes for respective drug.
[§]Subtypes that displayed significantly more discordances than subtype B for the susceptibility scoring to the respective drug are in brackets.

In contrast to the treatment-naive patient population, the proportions of discordances obtained for NNRTIs (5–8.3%) were lower than those for NRTIs (6–48%) in the treated patient population (Table 5). Differences were significant in an overall RTI drug comparison ($P < 0.0001$). Abacavir, tenofovir, zalcitabine and didanosine displayed significantly higher levels of discordances in a pairwise comparison with zidovudine, stavudine, lamivudine, nevirapine, delavirdine and efavirenz. The proportion of discordances did not differ significantly between the subtypes for the zidovudine, stavu-

dine and delavirdine scores. CRF06 revealed significantly higher levels of discordances for nevirapine and efavirenz than subtype B. However, as only one strain belonged to CRF06, one should take care not to overvalue this result. Subtype C was associated with significantly higher proportions of discordances for lamivudine than was subtype B. The results of the sub-analysis with only two susceptibility scores showed that the observed discordances were related to interalgorithm disagreement between the intermediate and susceptible scores, as well as between the intermediate and resistant scores.

Table 3. Interalgorithm discordances (%) between genotypic drug resistance interpretations of reverse transcriptase sequences obtained from treatment-naive patients infected with B and non-B HIV-1 subtypes

NRTI	Total analysis including 3 susceptibility scores (S, I, R)		Subanalysis including 2 susceptibility scores (S, R)			
	Discordances (%) ^{*,†}	Subtypes ^{‡,§}	I score assigned to S score (I = S)		I score assigned to R score (I = R)	
			Discordances (%) ^{*,†}	Subtypes ^{‡,§}	Discordances (%) [†]	Subtypes ^{‡,§}
Zidovudine	1.8	–	1.1	–	1.5	+
Abacavir	1.1	–	0	–	1.1	–
Tenofovir	1.1	–	0	–	1.1	–
Stavudine	1.1	–	0	–	1.1	–
Zalcitabine	0.4	+ (CRF11)	0	–	0.4	+ (CRF11)
Lamivudine	0	–	0	–	0	–
Didanosine	0	–	0	–	0	–
NNRTI						
Nevirapine	4.0	–	2.6	–	1.8	–
Delavirdine	3.7	–	2.6	–	1.5	–
Efavirenz	2.2	–	0	–	2.2	–

*Proportions of sequences that displayed discordances were significantly different when performing an overall drug comparison ($P < 0.0001$).
[†]Proportions of discordances that did not differ significantly from each other in a pairwise analysis are displayed in an identical font style (bold, regular or italic).
[‡]+, indicates that the proportion of discordances differed significantly between all subtypes for a respective drug ($P < 0.05$); –, indicates that the proportion of discordances did not differ significantly between all subtypes for respective drug.
[§]Subtypes that displayed significantly more discordances than subtype B for the susceptibility scoring to the respective drug are in brackets.

Table 4. Interalgorithm discordances (%) between genotypic drug resistance interpretations of protease sequences obtained from treated patients infected with B and non-B HIV-1 subtypes

PI	Total analysis including 3 susceptibility scores (S, I, R)		Subanalysis including 2 susceptibility scores (S, R)			
	Discordances (%) ^{*,†}	Subtypes ^{‡,§}	I score assigned to S score (I = S)		I score assigned to R score (I = R)	
			Discordances (%) ^{*,†}	Subtypes ^{‡,§}	Discordances (%) ^{*,†}	Subtypes ^{‡,§}
Ritonavir	31	–	<u>8</u>	–	28	–
Indinavir	27	+ (F)	<u>4</u>	–	25	+
Nelfinavir	<u>22</u>	+	<u>5</u>	+ (H)	21	+
Amprenavir	<u>20</u>	+ (F)	10	–	<u>17</u>	+ (F)
Saquinavir	<u>10</u>	+ (D, F, H)	<u>2</u>	+ (G, CRF13)	<u>10</u>	+ (D, F, H)
Lopinavir	25	+	17	+	<u>21</u>	+

*Proportions of sequences that displayed discordances were significantly different when performing an overall drug comparison ($P < 0.001$).

†Proportions of discordances that did not differ significantly from each other in a pairwise analysis are displayed in an identical font style (bold or underlined).

‡+, indicates that the proportion of discordances differed significantly between all subtypes for a respective drug ($P < 0.05$); –, indicates that the proportion of discordances did not differ significantly between all subtypes for respective drug.

§Subtypes that displayed significantly more discordances than subtype B for the susceptibility scoring to the respective drug are in brackets.

Prevalence of mutations and their contributions to genotypic drug resistance interpretation

For particular drugs, some non-B variants displayed significantly more discordance than subtype B. Therefore, we investigated whether certain amino acid changes that might influence the genotypic drug resistance interpretations (as recorded in Fig. 1) were more prevalent in some non-B variants. The analysis was restricted to the treatment-naïve

population because the analysis in the treated populations could be biased due to different treatment history in the different subtypes.

Compared to subtype B, the major mutation M46L was more prevalent in CRF13. Minor mutations at positions 10, 20, 36, 63, 77 and 93 of the protease were significantly more often observed in subtypes A (L10I, M36I), C (K20R, M36I, I93L), D (M36I), F (L10V, K20R, M36I), G (K20I, M36I), J (M36I, L63T), CRF01 (M36I), CRF02 (K20I, M36I, I93L), CRF05

Table 5. Interalgorithm discordances (%) between genotypic drug resistance interpretations of reverse transcriptase sequences obtained from treated patients infected with B or non-B HIV-1 subtypes

NRTI	Total analysis including 3 susceptibility scores (S, I, R)		Subanalysis including 2 susceptibility scores (S, R)			
	Discordances (%) ^{*,†}	Subtypes ^{‡,§}	I score assigned to S score (I = S)		I score assigned to R score (I = R)	
			Discordances (%) ^{*,†}	Subtypes ^{‡,§}	Discordances (%) [†]	Subtypes ^{‡,§}
Zidovudine	<u>6</u>	–	3.0	–	<u>6.0</u>	+ (H)
Abacavir	48	+	31	+	44	+
Tenofovir	39	+	32	+	35	+
Stavudine	21	–	<u>18</u>	–	15	–
Zalcitabine	44	+	22	+	38	+
Lamivudine	<u>10</u>	+ (C)	4	+ (C)	<u>10</u>	+ (C)
Didanosine	46	+	28	+	45	+
NNRTI						
Nevirapine	<u>5.0</u>	+ (CRF06)	4.0	–	<u>1.0</u>	+ (CRF06)
Delavirdine	<u>8.3</u>	–	<u>7.0</u>	–	<u>4.0</u>	+ (CRF06)
Efavirenz	<u>7.0</u>	+ (CRF06)	<u>6.0</u>	–	<u>7.0</u>	+ (CRF06)

*Proportions of sequences that displayed discordances were significantly different when performing an overall drug comparison ($P < 0.0001$).

†Proportions of discordances that did not differ significantly from each other in a pairwise analysis are displayed in an identical font style (bold, regular, italic or underlined).

‡+, indicates that the proportion of discordances differed significantly between all subtypes for a respective drug ($P < 0.05$); –, indicates that the proportion of discordances did not differ significantly between all subtypes for respective drug.

§Subtypes that displayed significantly more discordances than subtype B for the susceptibility scoring to the respective drug are in brackets.

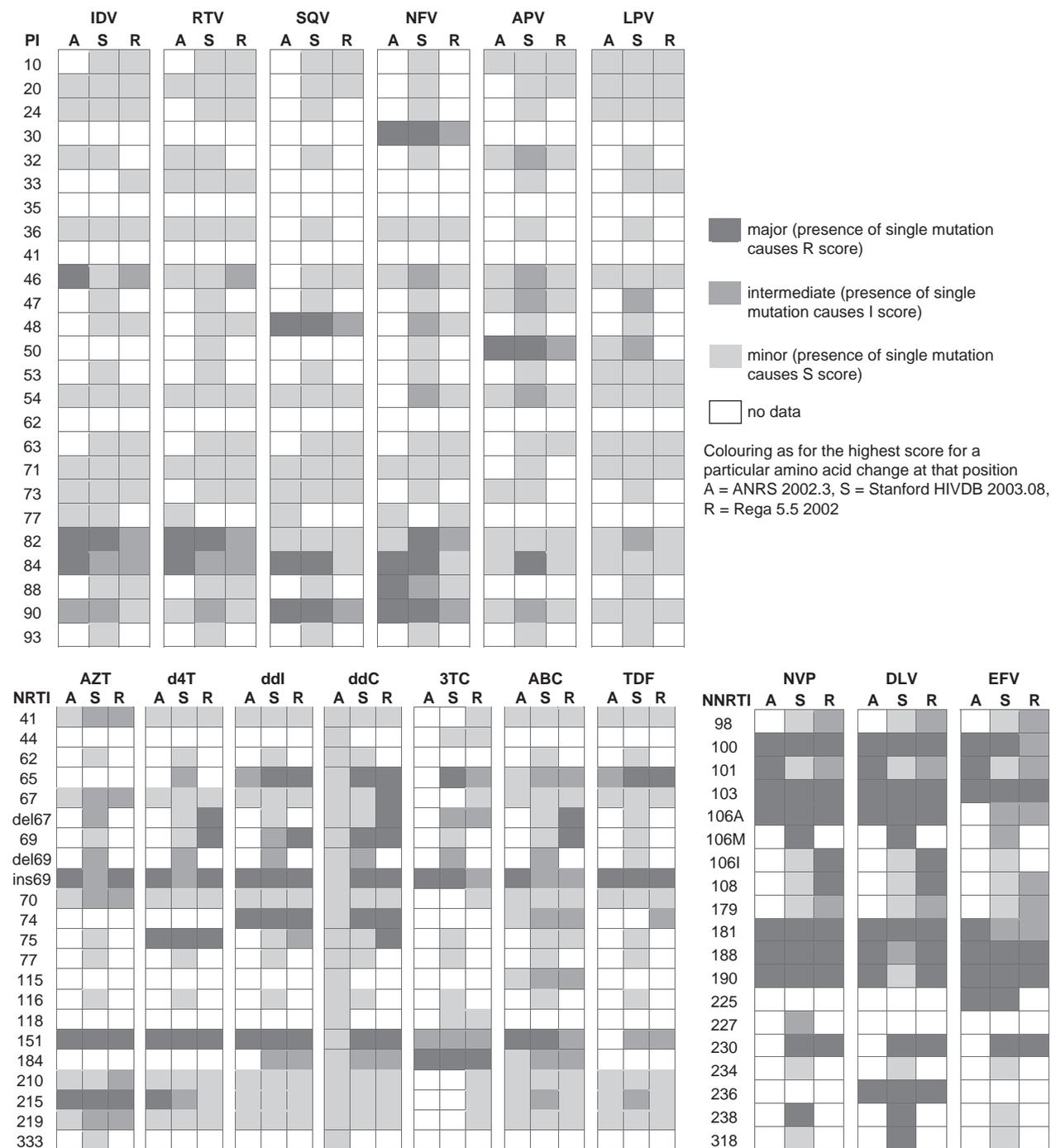


Fig. 1. Contribution of mutations to genotypic drug resistance interpretation in three different algorithms.

(L10V), CRF06 (K20I, M36I), CRF11 (L10I, L63T), CRF13 (K20I/L, M36I, L63S, V77I). The majority of non-B subtypes (A, C, E, G, J, CRF05, CRF11 and CRF13) had significantly more minor PI mutations than subtype B. The minor mutation L63P was less prevalent in subtypes A, CRF02 and CRF11 than in subtype B. V77I was less prevalent in subtypes A, E, G

and CRF02. At resistance-related positions, reverse transcriptase displayed fewer differences between non-B and B. Only V118I was significantly more prevalent in subtype D, and V179I significantly more prevalent in subtype A.

Irrespective of the subtype, the presence of single mutations in treatment-naive samples that were given clearly

different scores by the algorithms could also be responsible for some of the observed discordances (e.g. Protease: M46I/L (1.8%), L90M (0.4%); RT: A98G (0.3%), K101Q (0.3%), V106I (1.9%), V108I (0.75%), V179D/I (4.9%), F227L (0.3%)).

A summary is presented in Fig. 1 of the different positions of PI and RTI mutations and their individual impact on antiretroviral drug susceptibility, as scored by the three algorithms.

Discussion

The rules of algorithms are mainly derived from *in vitro* and *in vivo* data obtained on subtype B. However, the application of these different algorithms produces discordant interpretations even on subtype B strains (Ravela *et al.*, 2003; Sturmer *et al.*, 2003; Zazzi *et al.*, 2004). Non-B subtypes are, in addition, characterised by the presence of several resistance-related mutations that occur as natural variants (Pieniazek *et al.*, 2000; Vergne *et al.*, 2000; Kantor & Katzenstein, 2003). In this study, we examined to what extent this might result in interalgorithm discordances. We showed high levels of discrepancies between the different algorithms in ARV treatment-naive and treated patients infected with either non-B or B strains.

In treatment-naive patients, the highest discordances were seen in the protease gene. Minor mutations occurring naturally in non-B strains (positions 10, 20, 36, 63, 77 and 93 in protease) were responsible for the majority of discordances because combinations of them are associated with intermediate resistance by certain algorithms. In particular, the Rega algorithm, which predicts intermediate PI susceptibility when two minor mutations are present and suggests adopting alternative drug choice, contributed to the high interalgorithm discordance. Only for lopinavir was a low level of discordance observed, because in all algorithms a large number of minor mutations are required for a change in the susceptibility score. As a consequence, when the interalgorithm comparisons were made considering the intermediate level as susceptible, a better concordance was seen. It is necessary to further characterize the clinical relevance of this level in the prediction of PI susceptibility in non-B strains. Furthermore, the intermediate level is not similar for all algorithms, and has a higher score in ANRS and Stanford algorithms than in Rega. In the Rega algorithm, intermediate level just corresponds to alternative therapeutic choice. In addition, we arbitrarily classified the five levels of the Stanford algorithm in three levels, considering low-level resistance intermediate. The intermediate level classification related to minor mutations was the main source of interalgorithm discordances, with one algorithm assigning an intermediate level and the other algorithms a susceptible level. In subtype B-infected patients under

therapy, minor mutations occur during the accumulation of major mutations and help compensate for the reduced fitness of mutated viruses (Nijhuis *et al.*, 1999). Their natural presence in non-B strains could thus facilitate the rapid emergence of resistant strains (Perno *et al.*, 2001). Clinical studies on the efficiency of ARVs on non-B-infected patients in Europe and Africa, however, suggest a similar efficacy of PIs after 12–18 months, although a longer follow-up may be needed to confirm this (Frater *et al.*, 2001). The M46I mutation, associated with resistance to indinavir for ANRS, intermediate resistance to nelfinavir and amprenavir for Stanford, and intermediate resistance to indinavir and ritonavir for Rega, was observed significantly more often in CRF13 strains from patients residing in regions in Africa where PIs have either not yet been introduced or have been introduced only recently, and is probably a natural polymorphism. It is necessary to elucidate the role of this mutation.

In non-B strains from naive patients, we observed NNRTI resistance substitutions at major and intermediate positions, e.g. 98, 101, 106, 108 and 179. They were not significantly specific to a particular subtype or CRF. Certain algorithms considered these substitutions major, intermediate or minor mutations (definition from Fig. 1). Their implications for NNRTI susceptibilities await further clarification.

More interpretation discordances were observed in the treated than in the naive patients. Whereas major PI mutations were selected in only 28.8% of patients, similar levels of discordances were observed for predictions of PI susceptibilities in the naive and treated population. Discordances were mainly related to interpretations of minor mutations present as natural variants in non-B subtypes. The highest level of discordance was observed for the most recent PIs, amprenavir and lopinavir, reflecting the limited knowledge on their resistance.

For RTIs, the interpretations of complex mutation patterns were the main reason for interalgorithm discordances, especially those related to cross-resistance and antagonistic interactions. These discordances were seen in patients infected with B strains as well as those infected with non-B strains. The impact of NAMs on overall NRTI susceptibilities is difficult to assess. Stavudine, didanosine and tenofovir susceptibilities are difficult to measure because biological and clinical cut-offs overlap with reproducibility cut-offs. Some clinical studies showed that NAMs can be selected by stavudine and didanosine and patients with NAM mutated virus were reported to not or only partially respond to stavudine therapy (Coakley *et al.*, 2000).

Stanford and Rega algorithms consider that the M184V mutation is also associated with intermediate resistance to other NRTIs, such as abacavir, zalcitabine and didanosine. In addition, the M184V mutation can partially reverse T215Y-mediated resistance to zidovudine. This fact was not

considered in a similar way by all algorithms (implemented by Stanford and Rega, but not by ANRS). Numerous discordances were observed to interpret tenofovir and abacavir susceptibilities (39% and 48%, respectively) but few data are available to evaluate the mutations inducing resistance in these recently introduced drugs (Brun-Vézinet *et al.*, 2003).

For NNRTIs, discordant interpretations were related to the following mutations, Y181C, Y188L, G190A, which, depending on the algorithm, were considered resistant or intermediate resistant. In addition, the natural polymorphisms A98G, V106I and V108I, often observed in non-B subtypes, were also present in the treated population and led to interpretation discrepancies.

Interpretation algorithms are regularly updated; our results were analyzed with the 2003 algorithms. Only small modifications have been added since and our data are thus still relevant on the use of these algorithms on non-B variants. The aim of this study was to test the use of these algorithms on non-B variants, not to select one algorithm as the best one, as data about clinical outcome are limited. This study shows much discordance between genotypic drug resistance interpretation algorithms when applied to non-B strains from HIV-1 naive and treated patients. It is necessary to match different algorithms for better patient care. Further retrospective and prospective clinical studies in Europe and in developing countries are necessary to elucidate the interalgorithm discordances and to determine whether some subtypes or CRFs select other mutations at positions known for subtype B or even at positions which were not documented to be associated with resistance in B strains and whether minor mutations in non-B should be differently appreciated than in subtype B. More studies on the correlation between phenotype and genotype would also help to improve algorithms and elucidate the role of minor mutations as natural polymorphisms.

Acknowledgements

This work was partially sponsored by a grant from ANRS (National Agency for AIDS Research) in France (ANRS 1257) and by the AIDS Reference Laboratory of Leuven, which receives support from the Belgian Ministry of Social Affairs through a fund within the Health Insurance System.

References

Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, Marlink RG, Schapiro J, Roger M & Wainberg MA (2003) A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* **17**: F1–F5.

- Brun-Vézinet F, Descamps D, Ruffault A, *et al.* (2003) Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir. *AIDS* **17**: 1795–1802.
- Coakley EP, Gillis JM & Hammer SM (2000) Phenotypic and genotypic resistance patterns of HIV-1 isolates derived from individuals treated with didanosine and stavudine. *AIDS* **14**: F9–F15.
- De Luca A, Cingolani A, Di Giambenedetto S, *et al.* (2003) Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *J Infect Dis* **187**: 1934–1943.
- Frater AJ, Beardall A, Ariyoshi K, Churchill D, Galpin S, Clarke JR, Weber JN & McClure MO (2001) Impact of baseline polymorphisms in RT and protease on outcome of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected African patients. *AIDS* **15**: 1493–1502.
- Gomes P, Diogo I, Gonçalves MF, Carvalho P, Cabanas J, Lobo MC & Camacho R (2002) Different pathways to nelfinavir genotypic resistance in HIV-1 subtypes B and G [abstract 46]. 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2002, Seattle.
- Grossman Z, Paxinos E, Averbuch D, *et al.* (2004) Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2159–2165.
- Hirsch MS, Brun-Vézinet F, Clotet B, *et al.* (2003) Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* **37**: 113–128.
- Kantor R & Katzenstein D (2003) Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev* **5**: 25–35.
- Loomba H, Brenner B, Parniak MA, Ma'ayan S, Spira B, Moisi D, Oliveira M, Detorio M & Wainberg MA (2002) Genetic divergence of human immunodeficiency virus type 1 Ethiopian clade C reverse transcriptase (RT) and rapid development of resistance against nonnucleoside inhibitors of RT. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2087–2094.
- Los Alamos National Laboratory (2003) HIV sequence database. Available at: hiv-web.lanl.gov. Accessed September 2003.
- Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gustchina E, Albert J, Schipper P, Gulnik S & Boucher CA (1999) Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* **13**: 2349–2359.
- Parkin N, Chappey C, Maroldo L, Bates M, Hellmann NS & Petropoulos CJ (2002) Phenotypic and genotypic HIV-1 drug resistance assays provide complementary information. *J Acquir Immune Defic Syndr* **31**: 128–136.

- Peeters M, Toure-Kane C & Nkengasong JN (2003) Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* **17**: 2547–2560.
- Perno CF, Cozzi-Lepri A, Balotta C, *et al.* (2001) Secondary mutations in the protease region of human immunodeficiency virus and virologic failure in drug-naive patients treated with protease inhibitor-based therapy. *J Infect Dis* **184**: 983–991.
- Pieniazek D, Rayfield M, Hu DJ, *et al.* (2000) Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A–H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naive individuals worldwide. *AIDS* **14**: 1489–1495.
- Ravela J, Betts BJ, Brun-Vézinet F, *et al.* (2003) HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *J Acquir Immune Defic Syndr* **33**: 8–14.
- Ray SC (2003) Simplot software for windows, version 2.5. Available at: <http://www.med.jhu.edu/deptmed/sray/download/>. Accessed September 2003.
- Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J & Shafer RW (2003) Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* **31**: 298–303.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, *et al.* (2000) HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**: 55–56.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.
- Shafer RW (2002) Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **15**: 247–277.
- Shafer RW (2003) Stanford HIV RT and protease sequence database. Available at: http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivalg. Accessed September 2003.
- Sturmer M, Doerr HW & Preiser W (2003) Variety of interpretation systems for human immunodeficiency virus type 1 genotyping: confirmatory information or additional confusion? *Curr Drug Targets Infect Disord* **3**: 373–382.
- Van Laethem K, De Luca A, Antinori A, Cingolani A, Perno CF & Vandamme A-M (2002) A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients. *Antivir Ther* **7**: 123–129.
- Vandamme A-M, Witvrouw M, Pannecouque C, Balzarini J, Van Laethem K, Schmit J-C, Desmyter J & DeClercq E (1998) Evaluating clinical isolates for their phenotypic and genotypic resistance against anti-HIV drugs. *Methods in Molecular Medicine Vol. 24: Antiviral Chemotherapy Protocols* (Kinchington D & Schinazi RF, eds), pp. 223–258. Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA.
- Vergne L, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, *et al.* (2000) Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients. *J Clin Microbiol* **38**: 3919–3925.
- Vergne L, Malonga-Mouellet G, Mistou I, Mavoungou R, Mansaray H, Peeters M & Delaporte E (2002) Resistance to antiretroviral treatment in Gabon: need for implementation of guidelines on antiretroviral therapy use and HIV-1 drug resistance monitoring in developing countries. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**: 165–168.
- Vergne L, Kane CT, Laurent C, *et al.* (2003) Low rate of genotypic HIV-1 drug-resistant strains in the Senegalese government initiative of access to antiretroviral therapy. *AIDS* **17**: S31–S38.
- Zazzi M, Romano L, Venturi G, Shafer RW, Reid C, Dal Bello F, Parolin C, Palu G & Valensin PE (2004) Comparative evaluation of three computerized algorithms for prediction of antiretroviral susceptibility from HIV type 1 genotype. *J Antimicrob Chemother* **53**: 356–360.

B. DIVERSITE GENETIQUE AU CAMEROUN ET SENSIBILITE DU T20

I. Contexte de l'étude

Les deux principales classes d'ARV traditionnellement utilisées dans le traitement de l'infection à HIV que sont les inhibiteurs de la reverse transcriptase et les inhibiteurs de la protéase ont prouvé leur efficacité dans le contrôle de l'infection et l'amélioration des conditions de vie des patients. Cependant, l'apparition des résistances et la persistance de réservoirs viraux limitent leur utilisation sur le long terme. Il est donc nécessaire, voire urgent d'élaborer de nouvelles molécules et de nouvelles classes d'ARV pour pallier ces insuffisances. Les inhibiteurs de fusion représentent une nouvelle classe thérapeutique conçue sur le prototype HIV-1 sous-type B et ont prouvé leur efficacité chez les patients multi-résistants aux IRT et IP (92). La globalisation des souches HIV-1 non-B dans les zones où prédomine habituellement le sous-type B rend nécessaire l'évaluation de la sensibilité de cette molécule par rapport aux polymorphismes naturels des souches non-B.

II. Mécanisme d'action du T20

Les récents progrès réalisés dans la compréhension des processus impliqués dans la fusion et l'entrée du virus HIV dans les cellules hôtes ont conduit à l'élaboration de nouvelles approches antirétrovirales : les inhibiteurs de fusion et d'entrée. Le T20 ou Enfuvirtide (Fuzeon[®]) est le leader de cette nouvelle classe d'ARV et le premier approuvé par le FDA pour la commercialisation. Ce peptide de 36 aa est dérivé de la sous-unité HR2 de la gp41. Les deux sous-unité HR1 et HR2 (en bleu) de la gp41 devant interagir pour permettre la fusion des membranes cellulaire et virale, la fixation par compétition du T20 à la sous-unité HR1 bloque cette interaction et prévient ainsi la fusion et l'entrée du virus dans la cellule cible (Figure 18).

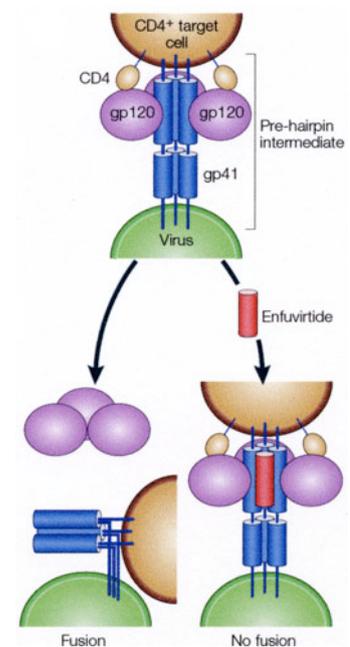


Figure 18. Mécanisme d'inhibition de fusion par le T20 (Enfuvirtide). (LaBonte, J. et al. 2003).

III. Matériel et Méthodes

Afin d'étudier l'impact du polymorphisme des souches HIV-1 non-B sur la sensibilité au T20, nous avons collecté des échantillons de sang total auprès de donneurs de sang naïfs de tout traitement ARV dans différentes banques de sang du Cameroun. Les échantillons identifiés positifs à l'infection à HIV ont été génétiquement caractérisés dans l'enveloppe sur un fragment gp41 de 460 pb couvrant les sous-unités HR1 et HR2. Les séquences protéiques des sous-unités HR1 et HR2 de 184 échantillons représentatifs de la diversité génétique du HIV-1 au Cameroun [132 (71.7%) CRF02-AG, 14 (7.6%) sous-type A, 11 (5.9%) F2, 9 (4.8%) D, 8 (4.3%) G, 4 (2.1%) CRF01-AE, 4 (2.1%) CRF11-cpx et 2 (1.1%) CRF06-cpx] ont été déduites. Le polymorphisme de la région HR1 a été étudié en comparant pour les différents isolats cette région à celle du consensus de leur sous-type respectif. Les séquences HR2 ont été comparées à celle du prototype HIV-1 B afin d'évaluer leur variabilité par rapport à cette souche de référence. Ceci étant aussi important dans la mesure où la région HR2 est aussi la cible d'inhibiteurs de fusion en cours d'élaboration tel que le 5-Helix dérivé de la région HR1.

IV. Résultats

Des études *in vitro* ainsi que des résultats d'essais cliniques montrent que des changements génétiques dans la région HR1 et particulièrement au niveau du motif tripeptidique "GIV" (aa 36 – 38) sont liés à des résistances majeures au T20 (330). En effet, les mutants G36D et V38A sont fortement résistants au T20. Les substitutions Q40H, N42T, N43D, N43S et N43K sont aussi associées à des gains de résistance importante au T20 (335). Les combinaisons de mutations (G36S/L44M, N42T/N43S ou N42T/N43K) observées chez des patients sous traitement au T20 entraînent une augmentation de la CI_{50} de 60 fois. L'étude du polymorphisme des séquences HR1 des souches HIV-1 non-B du Cameroun a révélé la présence de quelques substitutions principalement en position 42: N42S (80%), N42G (2%) et N42R (1%), mais aucune mutation associée à la résistance au T20 n'a été identifiée. Par contre, dans la région HR2 d'où est dérivé le T20, nous avons observé un nombre assez important de mutations avec moins de 30% des sites conservés. Cependant, tous les sites décrits comme étant essentiels à l'efficacité du 5-Hélix étaient conservés.

V. Discussion et Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré sur un panel de 184 échantillons HIV-1 non-B, la bonne conservation de la région HR1 de la gp41, site de fixation du T20. Néanmoins, il apparaît aussi que la variabilité de la sous-unité HR2 est très importante bien que les positions impliquées dans l'interaction et la fixation de la molécule expérimentale 5-Helix soient assez conservées. Des analyses *in vitro* sur les souches HIV-1 sous-type C ont montré que l'interaction HR1 – HR2 tolérait assez bien les variations génétiques (81). Plusieurs mutations ont été rapportées par différentes études dans les sous-unités HR1 et HR2 et leur implication réelle sur la sensibilité des virus au T20 est encore mal connue (92, 330). Nous en avons identifiées plusieurs en position 42 de la sous-unité HR1 et beaucoup plus dans la région HR2. L'introduction récente de l'Enfuvirtide dans le traitement de l'infection à HIV implique l'élargissement des études permettant de mieux identifier les mutations associées ou non à la résistance au T20, ainsi que les mécanismes d'apparition de ces résistances.

VI. Publication

Ce travail a été publié dans *AIDS Research and Human Retroviruses*.

Aghokeng, A. F., Ewane, L., Awazi, B., Nanfack, A., Delaporte, E., Zekeng, L., and Peeters, M. (2005). Enfuvirtide binding domain is highly conserved in non-B HIV type 1 strains from Cameroon, West Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**(5):430-433.

Sequence Note

Enfuvirtide Binding Domain Is Highly Conserved in Non-B HIV Type 1 Strains from Cameroon, West Central Africa

AVELIN FOBANG AGHOKENG,^{1,2} LÉONARD EWANE,¹ BIH AWAZI,¹ AUBIN NANFACK,¹
ERIC DELAPORTE,² LÉOPOLD ZEKENG,¹ and MARTINE PEETERS²

ABSTRACT

Recently T-20 or enfuvirtide, the first drug of a new class of antiretrovirals targeting the entry stage of the virus life cycle, has been clinically approved. Enfuvirtide is a peptide derived from the HR2 region of the transmembrane glycoprotein from the HXB2 HIV-1 subtype B prototype strain that binds to the HR1 region. Drug resistance seems to occur in the HR1 region between amino acids 36 and 45. We examined to what extent this region is conserved in 184 non-B strains from Cameroon: 132 (71.7%) CRF02-AG, 14 (7.6%) subtype A, 11 (5.9%) F2, 9 (4.8%) subtype D, 8 (4.3%) subtype G, 4 (2.1%) CRF01-AE, 4 (2.1%) CRF11-cpx, and 2 (1.1%) CRF06-cpx. Among the 184 strains studied, no amino acid mutation was found in the highly conserved three amino acid motif at codons 36–38 (GIV) that are important determinants of viral susceptibility to enfuvirtide. Other common substitutions like Q40H and N42T were also absent. The N42S polymorphism was present in 148 (80.4%) strains. Analysis of the HR2 domain, from which the peptide is derived, indicated a much greater genetic variability as compared to HR1.

HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY TO TREAT HIV-INFECTED PATIENTS is mainly based on a combination of protease and reverse transcriptase inhibitors or a combination of two classes of reverse transcriptase (RT) inhibitors. However, resistance to these drugs, the persistence of latent viral reservoirs, and long-term toxicities require the continuous need to improve these classes of drugs and to develop new drugs with other targets. Recently, the first drug of a new class of antiretrovirals (ARVs) targeting the entry stage of the virus life cycle was clinically approved. T-20, or enfuvirtide, is a 36-amino acid peptide derived from a continuous sequence within the second heptad repeat (HR2) from the transmembrane glycoprotein from the HXB2 HIV-1 subtype B prototype strain. The peptide binds to the HR1 region and thus prevents gp41-mediated fusion with the host cell membrane.¹ Enfuvirtide exhibits few interactions with other ARVs and has been shown to be effective in salvage regimens for patients with multiresistant viruses to

the other classes of drugs.¹ Despite its cutaneous route of administration and its high cost, the use of this drug remains limited to the United States and Europe where subtype B HIV-1 strains from which the peptide is derived predominate. However, it has to be noted that the majority of HIV-1 infections worldwide are with other HIV variants and that the proportion of non-B strains is increasing in the Western hemisphere.² Non-B strains harbor many polymorphisms as compared to B, and for protease and RT inhibitors it is shown that this genetic diversity can influence the susceptibility to ARVs.³ Actually, only limited data are available on polymorphism in the target regions of enfuvirtide, either as the number of samples tested or as different subtypes/circulating recombinant forms (CRFs) tested.^{4–8} Drug resistance to this new drug seems to occur in the HR1 region and more precisely between amino acids 36 and 45.⁹

We therefore examined the extent to which this region is conserved in non-B strains and we genetically characterized the

¹Laboratoire de Santé Hygiène Mobile, Yaoundé, Cameroon.

²UMR 145, IRD, Université de Montpellier I, Montpellier, France.

env gp41 region of 184 group M strains from Cameroon. Cameroon is located in West Central Africa, and is characterized by a high genetic diversity of HIV-1. All HIV-1 groups (M, N, and O) cocirculate, and within group M, which predominates, many subtypes and CRFs are present in Cameroon.¹⁰ The samples were collected in 2001 among ARV treatment-naïve blood donors attending blood banks in distinct localities in Cameroon. For all samples, plasma was stored and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by Ficoll gradient centrifugation. Proviral DNA was extracted from uncultured PBMCs with the QIAamp Viral DNA Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). The gp41 region from env was amplified by nested polymerase chain reaction (PCR) with the previously described primers gp40F1 and gp40R1 as outers and gp46F2 and gp48R2 as inners. This 460-bp fragment contained the HR1 and HR2 domains. PCR conditions were as previously described.¹¹ The amplified gp41 fragments were purified with the QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) and directly sequenced with the DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France), using an automated sequencer (373A Stretch model, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL W with minor manual adjustments, bearing in mind the protein sequences.¹² Phylogenetic trees using the neighbor-joining method and reliability of the branching orders using the bootstrap approach were implemented with CLUSTAL W. Genetic distances were calculated with the Kimura 2-parameter method.

The newly determined sequences were aligned with the known HIV-1 sequences representing the different genetic subtypes and reference strains from the CRFs documented in West and West Central Africa (CRF01-AE, CRF02-AG, CRF06-cpx, CRF11-cpx and CRFcp13).¹³ To clearly identify whether a sequence belonged to a subgroup corresponding to a CRF within a certain subtype, phylogenetic analysis was done for each sequence individually. These different trees were constructed for each group of new sequences that was thought to cluster together. The amino acid sequences from the new sequences were compared to the HR1 and HR2 amino acid sequences of the prototype HXB2 strain from which the enfuvirtide peptide was derived.

Among the 184 strains studied the subtype/CRF distribution was as follows in decreasing order of importance: 132 (71.7%) CRF02-AG, 14 (7.6%) subtype A, 11 (5.9%) F2, 9 (4.8%) subtype D, 8 (4.3%) subtype G, 4 (2.1%) CRF01-AE, 4 (2.1%) CRF11-cpx, and 2 (1.1%) CRF06-cpx.

Genetic changes within the 36–45 amino acid region of HR1 have been shown to confer resistance to T20; mutations in the highly conserved three amino acid motif at codons 36–38 (GIV) are particularly important determinants of viral susceptibility to enfuvirtide.⁹ Among the 184 strains studied, this motif was remarkably well conserved (Fig. 1). No amino acid mutation was found at positions occupied by these three amino acids. Other common substitutions observed in phase II and III studies, including Q40H and N42T, were absent in our study population. *In vitro* studies showed that site-directed HR1 mutants G36D,

Polymorphism of the HR1 region													
Consensus	aa 36						aa 45						
A n = 14	L *	S *	G *	I *	V *		Q *	Q *	Q *	S 2N	N *	L *	L *
D n = 9	L *	S *	G *	I *	V *		Q *	Q *	Q *	N 1S	N *	L *	L *
F2 n = 10	L *	S *	G *	I *	V *		Q *	Q *	Q *	S 4N	N *	L *	L *
G n = 8	L *	S *	G *	I *	V *		Q *	Q IK	Q *	S 2G 1N	N *	L *	L *
CRF01_AE n = 4	L *	S *	G *	I *	V *		Q *	Q *	Q *	S *	N *	L *	L *
CRF02_AG n = 132	L *	S *	G *	I *	V *		Q 1L	Q *	Q *	S 14N 2R 2G	N *	L *	L *
CRF06_cpx n = 2	L *	S *	G *	I *	V *		Q *	Q *	Q *	S *	N *	L *	L *
CRF11_cpx n = 4	L *	S *	G *	I *	V *		Q *	Q *	Q *	S IN	N *	L *	L *

FIG. 1. Sequence variability of the HR1 region of gp41 (aa 36–45) from HIV-1 group M specimens. *n* represents the number of isolates tested. Asterisks represent conserved amino acids in all isolates and a number followed by a letter represents the number of isolates with the same amino acid substitution represented by the letter. The positions involved in the enfuvirtide sensitivity (36–38) are shaded in gray and amino acid residues are in bold characters.

AY551630; AY551635; AY551643–AY551645; AY551650; AY551654; AY551658–AY551660; AY551662; AY551663; AY551666; AY551667; AY551672; AY551680; AY551681; AY551684; AY551685; AY551688–AY551690; AY551692; AY551693; AY551697–AY551699; AY551703; AY551705; AY551706; AY551709; AY551712; AY551715; AY551718–AY551720; AY551722–AY551724; AY551727; AY551728; AY551730; AY551735–AY551737; AY551744; AY551745; AY551748; AY551750–AY551755; AY551759; AY551763–AY551767; AY551783; AY551785; AY551786; AY551788–AY551790; AY551792–AY551796; AY551798–AY551800; AY551802; AY551805–AY551807; AY5518010; AY551812; AY551814; AY551819; and AY842037–AY842127.

REFERENCES

- Cooper DA and Lange J: Peptide inhibitors of virus-cell fusion: Enfuvirtide as a case study in clinical discovery and development. *Lancet Infect Dis* 2004;4:426–436.
- McCutchan FE: Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* 2000;14(Suppl. 3):S31–44.
- Kantor R and Katzenstein D: Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev* 2003;5:25–35.
- Xu L, Hué S, Taylor S, *et al.*: Minimal variation in T-20 binding domain of different HIV-1 subtypes from antiretroviral-naive and -experienced patients. *AIDS* 2002;16:1684–1686.
- Roman F, Gonzalez D, Lambert C, *et al.*: Uncommon mutations at residue positions critical for enfuvirtide (T-20) resistance in enfuvirtide-naive patients infected with subtype B and non-B HIV-1 strains. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:134–139.
- Villahermosa ML, Perez-Alvarez L, Carmona R, *et al.*: Primary resistance mutations to fusion inhibitors and polymorphism in gp41 sequences of HIV-1 non-B subtypes and recombinants. *AIDS* 2003;17:1083–1086.
- Cilliers T, Patience T, Pillay C, Papathanasopoulos M, Morris L: Sensitivity of HIV-1 subtype C isolates to the entry inhibitor T-20. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:477–482.
- Hanna SL, Yang C, Owen SM, and Lal R: Resistance mutation in HIV entry inhibitors. *AIDS* 2002;16:1603–1608.
- Rimsky LT, Shugars DC, and Matthews TJ: Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived fusion inhibitor T-20 monotherapy. *J Virol* 1998;72:986–993.
- Vergne L, Bourgeois A, Mpoudi-Ngole E, *et al.*: Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology* 2003;310(2):254–266.
- Aghokeng A, Ewane L, Awazi B, Nanfack A, Delaporte E, Peeters M, and Zekeng L: Evaluation of four simple/rapid assays and two fourth generation ELISAs for the identification of human immunodeficiency virus infection on a serum panel representing the HIV-1 group M genetic diversity in Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37(5):1632–1640.
- Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22(22):4673–4680.
- Peeters M, Toure-Kane C, and Nkengasong JN: Genetic diversity of HIV in Africa: Impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2003;17(18):2547–2560.
- Mink M, Greenberg ML, Mosier S, *et al.*: Impact of HIV-1 gp41 amino acid substitutions (positions 36–45) on susceptibility to T-20 (enfuvirtide) in vitro: Analysis of primary isolates recovered from patients during chronic enfuvirtide treatment and site-directed mutants in NL4-3 (abstract). *Antivir Ther* 2002;7:S17–18.

Address reprint requests to:

Martine Peeters

Laboratoire Retrovirus

IRD

911 Avenue Agropolis

BP64501

34394 Montpellier Cedex 5, France

E-mail: martine.peeters@mpl.ird.fr

Partie 2: STV

📌 OBJECTIFS

L'origine simienne des HIV-1 et HIV-2 soulève de nombreuses questions en thème de santé publique dans les régions où circulent des lentivirus simiens, mais aussi dans le reste du monde vu la propagation actuelle des HIV. Les primates africains sont les hôtes naturels de lentivirus, dont deux; le SIVcpz du chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) et le SIVsmm du mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) sont respectivement à l'origine des HIV-1 et HIV-2 (161). Près de 36 espèces de primates africains sont reconnues porteuses d'un SIV, un seul étant identifié chez les *Hominidae* (Chimpanzé) et tous les autres se retrouvant chez les petits singes ou singes de l'ancien monde qui appartiennent à la famille des *Cercopithecidae* (50). La transmission à l'homme de virus provenant de chacune de ces deux familles de primates montre qu'elle n'est pas limitée par la barrière de l'espèce, car si l'homme et le chimpanzé appartiennent à la même famille, il n'en est pas de même avec le mangabey enfumé. Cela est extrêmement inquiétant, et montre qu'en théorie des SIV autres que le SIVcpz et le SIVsmm peuvent franchir cette barrière entre humains et primates non-humains. Il est démontré que les SIVcpz et SIVsmm ont été transmis à l'homme en de multiples occasions, mais les circonstances et les mécanismes exactes de ces transmissions restent inconnues (358). La chasse, le dépeçage et la consommation de viande de brousse, de même que les morsures de primates et le contact avec les tissus infectés (fèces, urines ...) sont autant de possibilités de contact entre primates infectés et humains, et sont des facteurs à risque pouvant entraîner des zoonoses (161, 304). La chasse et la consommation de la viande de brousse, de même que l'utilisation de singe comme animal de compagnie sont des pratiques assez courantes en Afrique subsaharienne, et particulièrement au centre et à l'ouest de l'Afrique, foyers d'origine des HIV-1 et HIV-2 (29, 148, 253). Dans étude réalisée en 2002 au Cameroun, il a été montré que les populations locales étaient couramment exposées à une importante diversité de SIV à travers la chasse et la consommation de la viande de brousse (304). Aujourd'hui, il est difficile d'évaluer les risques réels d'une nouvelle zoonose lentivirale ayant pour origine les primates non-humains, et de vérifier l'existence de nouvelles transmissions de SIV du singe à l'homme et ce pour plusieurs raisons:

📌 *L'épidémiologie et la diversité des SIV chez les primates non-humains restent mal comprises. Plusieurs espèces n'ont encore fait l'objet d'aucune étude et certaines espèces l'ont été sur un nombre très limité d'échantillons ou d'individus.*

↪ *L'absence d'outils de diagnostic spécifiques à l'identification des SIV ne permet pas d'apprécier la diversité et la prévalence réelles de ces virus chez leurs hôtes naturels. Les tests de dépistage du HIV utilisés dans ce but n'étant pas appropriés.*

↪ *Et enfin, le manque d'outils de diagnostic spécifiques au SIV rend difficile la recherche de SIV chez l'homme.*

Les travaux de la deuxième partie de cette thèse avaient pour objectif principal l'évaluation des risques de nouvelles zoonoses lentivirales dues aux primates non-humains en Afrique subsaharienne et particulièrement au Cameroun, ceci à travers trois objectifs spécifiques :

- ① *Développer des outils de diagnostic sérologique spécifiques à l'identification des SIV.*
- ② *Evaluer les prévalences réelles des infections à SIV chez les primates non-humains.*
- ③ *Caractériser les lentivirus simiens auxquels les hommes sont fréquemment exposés.*

Chapitre I

Développement d'outils sérologiques pour la détection des Lentivirus simiens et évaluation des prévalences de l'infection à SIV chez les primates non-humains

I. Introduction

Les virus de l'immunodéficience simienne (SIV) représentent un groupe de lentivirus qui infectent diverses espèces de primates non-humains en Afrique subsaharienne (34, 303). Bien qu'apparemment non-pathogènes pour leurs hôtes naturels, ces virus ont un grand intérêt en santé publique depuis que deux d'entre eux sont reconnus à l'origine des virus responsables du SIDA chez l'homme, les virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (HIV-1 et HIV-2). Il est maintenant bien établi que le HIV-1 résulte de transmissions inter-espèces du SIVcpz infectant naturellement les chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) à l'ouest de l'Afrique centrale; similairement, le HIV-2 résulte de transmissions inter-espèces du SIVsmm infectant le mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) en Afrique de l'ouest (93, 102, 145, 161, 313, 438). A ce jour, les analyses sérologiques ont mis en évidence la présence d'un SIV dans 36 espèces de primates et des séquences partielles ou complètes ont été identifiées dans 30 de ces espèces (50). Les analyses phylogénétiques de ces séquences ont révélé un extraordinaire degré de diversité génétique, avec des divergences entre séquences protéiques allant jusqu'à 60% (50). Cependant, la diversité des SIV est généralement spécifique à l'espèce, c'est-à-dire que les SIV se groupent en lignées phylogénétiques en fonction de leur espèce d'origine, qui est utilisée pour les classer en ajoutant un code de trois lettres reflétant le nom commun de leur espèce.

Bien qu'il soit reconnu que les SIVcpz et SIVsmm ont été transmis à l'homme à de multiples occasions (93, 102, 145, 438), le potentiel de transmission à l'homme des autres lentivirus de primates reste inconnu. Dans une récente étude sur le commerce de la viande de brousse au Cameroun, il a été montré qu'une importante proportion de singes vivant dans la nature était porteuse de SIV (304). Parmi 788 singes représentant 16 espèces différentes, des anticorps anti-SIV ont été mis en évidence dans une fraction importante (17%) par croisement avec les antigènes HIV-1 et HIV-2 du test INNO-LIA. Des analyses PCR sur une partie de ces échantillons croisant avec les antigènes HIV ont conduit à l'identification de nouvelles lignées SIV jusque-là inconnues. Cette étude démontrait ainsi pour la première fois que les hommes qui chassent et dépècent les primates sont couramment exposés à une importante diversité de SIV. Cependant, la prévalence exacte des infections SIV dans les 16 espèces étudiées ne pouvait être déterminée par manque de connaissances précises sur les capacités de croisement des antigènes HIV.

Vu l'extraordinaire degré de diversité des lentivirus de primates, aucun test basé uniquement sur une souche HIV ou SIV n'est capable de détecter les antigènes dirigés contre

toutes les autres souches. Pour développer des tests spécifiques à la détection des anticorps anti-SIV, plusieurs équipes ont développé de peptides antigéniques multiples ou linéaires, couvrant la boucle V3 et/ou la région immunodominante de la gp41 des SIV comme antigènes de capture d'anticorps (254, 279). Bien que cette approche ait permis avec succès la détection d'anticorps spécifiques à l'espèce dans une sélection de sérums de référence de primates et d'humains, toutes les lignées SIV connues n'ont pas encore été ciblées par ces peptides et leur efficacité à diagnostiquer les infections SIV chez les primates sauvages représentant différentes espèces reste à déterminer (254, 279). Enfin, des immunoblots de confirmation pour les SIV autres que les SIVcpz/HIV-1 et SIVsmm/HIV-2 n'ont pas encore été développés.

Pour caractériser l'épidémiologie des infections naturelles à SIV, nous avons exprimé la région immunodominante de la gp41 pour 11 différentes lignées SIV et utilisé ces protéines recombinantes en plus de leurs peptides V3 correspondants, comme antigènes ELISA pour tester 722 sérums de primates et rechercher des anticorps dirigés contre des SIV de la même (homologues) et d'autres (hétérologues) espèces. Les résultats ont révélé une surprenante distribution des prévalences, allant de l'apparente absence de SIV dans certaines espèces à de très forts taux (50%) d'infection dans d'autres. De plus, le nombre global de positifs identifiés par les ELISA gp41 recombinants était considérablement inférieur à celui de l'INNO-LIA, suggérant que pour certaines espèces, les prévalences étaient surestimées par l'INNO-LIA. Ces données montrent donc que toutes les infections naturelles à SIV ne sont pas aussi communes et largement répandues que précédemment rapportées et que les tests spécifiques de dépistage et de confirmation sont nécessaires pour déterminer l'étendue réelle de l'infection à SIV chez les primates vivant dans la nature.

II. Matériel et Méthodes

Production et purification des protéines recombinantes (gp41) pour différentes souches SIV. Un fragment de gène couvrant l'ectodomaine de la région transmembranaire (gp41) de l'enveloppe correspondant aux acides aminés 31 – 168 de la gp41 du HIV-1 HXB2 (N° d'accèsion Genbank **K03455**) a été amplifié pour les clones moléculaires du SIVcpzTAN1 (**AF447763**), SIVsmmCI2 (non publié), SIVrcmGAB1 (**AF382829**), SIVgsn99CM166 (**AF468659**), SIVmus01CM1085 (**AY340700**), SIVmon99CMCML1 (**AY340701**), SIVmnd2-14CG (**AF328295**), SIVdebCM40 (**AY523865**), SIVtal00CM266 (non publié), SIVsykKE51 (**AY523867**) et SIVcolCGU1 (**AF301156**) et cloné dans un vecteur d'expression bactérien. Après culture des bactéries, les protéines recombinantes ont été produites sous forme de complexe protéine-polyhistidine et purifiées par chromatographie d'affinité.

Peptides synthétiques de la boucle V3. Des peptides synthétiques correspondant à la boucle V3 du domaine extracellulaire de l'enveloppe (gp120) appartenant à différentes lignées et variants SIV ont été commandés chez Neosystem (Strasbourg, France). Les séquences de ces différents peptides ainsi que les variants SIV correspondants sont résumés dans le Tableau 3. Pour les souches SIV dont les séquences V3 sont identiques ou presque, un seul des représentants a été synthétisé. C'est le cas pour les souches SIVgsn, SIVmus et SIVmon (95) pour lesquels seule la V3 du SIVgsn a été synthétisée, de même seule la V3 du SIVmnd2 a été synthétisée pour SIVmnd-1 et SIVmnd-2 qui sont monophylétiques dans l'enveloppe (Figure 19). Enfin, des séquences V3 consensus ont été synthétisées pour les lignées SIVagm et SIVsmm (Tableau 3).

ELISA gp41 recombinant. Des plaques pour ELISA (Corning, Corning, N.Y.) sont incubées avec des protéines recombinantes (100 µl/puit) à 1 µg/ml (protéine totale dans du PBS, pH 7,2) à 4°C sur la nuit. Elles sont ensuite lavées avec du PBST (PBS avec 0,1% de Tween-20), saturées avec un tampon bloquant (PBS, 0,5% Tween-20, 5% de lait en poudre maigre) pendant 1h à 37°C et lavées avec du PBST. Les sérums préalablement dilués (1 :100) dans du tampon de saturation sont ajoutés dans chaque puit (100 µl/puit), incubés pendant 1h à 37°C et lavés avec du PBST. 100µl d'IgG anti-humain de chèvre conjugué à la peroxydase (Southern Biotech, Birmingham, AL) dilués 20 000 fois dans du tampon de saturation sont ajoutés dans chaque puit et incubés pendant 1h à 37°C. Après lavage avec du PBST, 100 µl de

Tableau 3. Séquences des peptides V3 utilisés dans les ELISA et représentant différentes lignées SIV.

SIV	Lignée SIV	Séquence V3
SIVcpz-ant	HIV-1/SIVcpz	NRTVRNLQIGPGMTFYNVEIATGDTRKAFC
SIVgsn-166	SIVgsn/mon/mus	GNKTIRNLQIGAGMTFYSQVIVGGNTRKAYC
SIVagm-consensus	SIVagm	GNKTVLPVTIMAGLVFHSQKYNTLLRQAWC
SIVsmm-consensus	HIV-2/SIVsmm	GNKTVVPITLMSGVLVFSQPINKRPRQAWC
SIVsyk	SIVsyk	GNESIKNIQLAAGYFLPVIQGLKTGRDAKRAFC
SIVrcm	SIVrcm	SNRTVKGISLATGVFISLRVEKRPKGAWC
SIVmnd-1	SIVmnd	GNRSVVSTPSATGLLFYHGLEPGKLNKKGMC
SIVlho	SIVlho/sun	GNRSEVSTISSTGLLFYYGLEHGSRLRLAQC
SIVcol	SIVcol	GNSSHRNLNTANGAKFYELIPYSKGIYGRC
SIVdeb	SIVdeb	GNKTYRAVHMATGLSFYTTFFIPRLRIKRAHC

substrat 3,3', 5,5'-Tetramethyl benzidine (TMB) sont ajoutés dans chaque puits (Sigma, St. Louis, MO) et incubés pendant 20 min à température ambiante et à l'obscurité. La réaction est arrêtée par l'ajout de 100 µl d'acide sulfurique 1N (H₂SO₄) et les valeurs de densité optique (DO) sont lues à 450 nm contre 630 nm avec un spectrophotomètre EX-800 ELISA Reader (BIO-TEK Instruments, Inc. Winooski, VT).

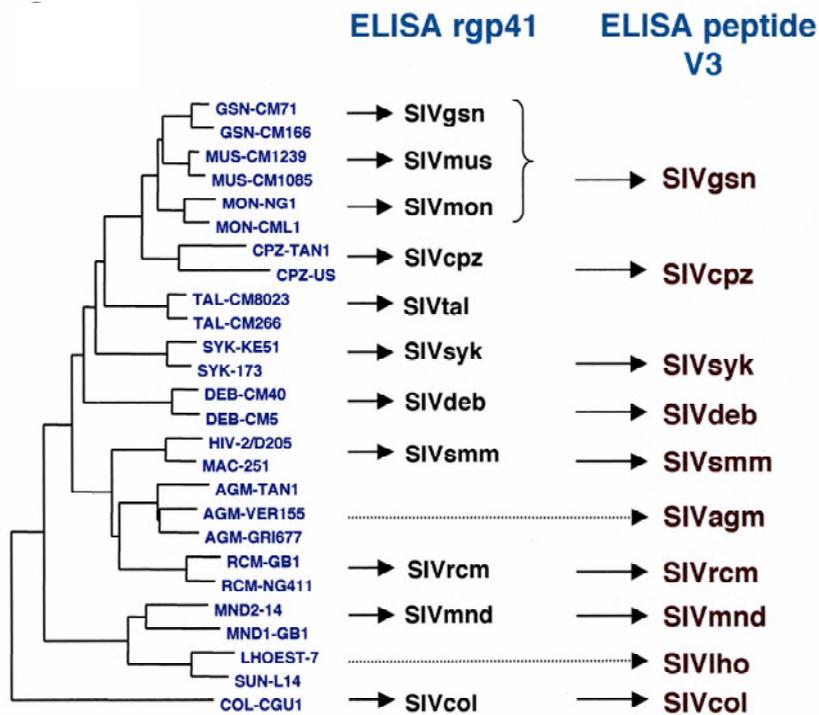


Figure 19. Relation phylogénétique des lentivirus de primates basée sur les séquences protéiques Env par la méthode du plus proche voisin (Saitou and Nei, 1987). Les souches SIV utilisées pour l'élaboration des protéines recombinantes rgp41 et/ou des peptides V3 sont indiquées.

ELISA des peptides synthétiques V3. Des plaques de polyvinyle sont incubées avec chaque peptide (0,25 µg/puit) dilué dans un tampon basique (bicarbonate à 0,05M, pH 9,6) pendant 20h ± 2h à 37°C. Après lavage avec un tampon phosphate (PBS, 0,5% Tween-20), les sites inoccupés par les peptides sont bloqués avec un tampon phosphate contenant 5% de sérum fœtal de veau (SFV) pendant 2h à 37°C, suivi par un lavage au PBS-Tween. Les sérums dilués 100 fois dans un tampon phosphate hypertonique (Phosphate de sodium 0,01M, pH7,4; 0,75 M NaCl; 10% SFV et 0,5% de Tween-20) sont ajoutés dans chaque puit. Après incubation pendant 30 min à température ambiante, les plaques sont lavées et incubées avec des IgG anti-humains de chèvre conjugués à la peroxydase pendant 30 min à température ambiante. Après lavage avec du PBS-Tween, la réaction est développée avec de l'orthophénylènediamine (OPD) pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. La réaction est arrêtée par ajout d'acide sulfurique 2N (H₂SO₄) et les DO lues à 492 nm.

Western blot SIVgsn-spécifique. Un gène codant pour la glycoprotéine d'enveloppe gp160 du SIVgsn (pCMV/R-SIVgsnEnv) a été produit à partir du prototype SIVgsn-166 (**AF468659**). La co-transfection de cellules 293T avec un vecteur mutant HIV-1-SIVgsnenv nous a permis de produire des pseudovirions contenant le gène *env* du SIVgsn. Des protéines Gag HIV-1 et Env-SIVgsn ont ainsi été produites par l'expression de ces pseudovirions. Après électrophorèse, ces protéines ont été transférées sur bandelettes de nylon pour obtenir au final des bandelettes de western blot contenant les protéines Env SIVgsn (gp160, gp120 et gp41) et Gag HIV-1 (p55, p24, p17). Les sérums de moustacs et de singes hocheurs ont été testés avec ce western blot pour la présence d'anticorps anti-SIV.

Sérums de référence de primates au statut infectieux connu. Un panel de sérums correctement caractérisés a été constitué à partir de 207 échantillons de primates chez lesquels l'infection par un SIV avait été soit confirmée ou infirmée par PCR et séquençage (Tableau 4). La majorité des échantillons provenait d'une précédente étude sur la viande de brousse au Cameroun (304) et avait été collectée chez différentes espèces de primates (infectés/ou non): des singes de Brazza (5 infectés/3 non-infectés), des moustacs (4/31), des singes hocheurs (6/47), des cercopithèques mona (1/1), des mandrills (7/4), des colobes guéréza (8/9) et des talapoins du nord (2/6). D'autres sérums provenant de cercocèbes à collier blanc infectés (2), d'un singe de Brazza et d'un colobe guéréza ont été identifiés plus récemment. Des sérums ont aussi été obtenus de chimpanzés en captivité (3/1), de mangabeys enfumés en captivité (9/7) et de cercopithèques à diadème sauvages (14/35).

Tableau 4. Panel des sérums de référence provenant de différentes espèces de primates infectés et non-infectés par un SIV.

Espèce	Nom commun	SIV	SIV pos (n)	SIV neg (n)
<i>Cercopithecus neglectus</i>	Singe de Brazza	SIVdeb	6	3
<i>Cercopithecus cephus</i>	Moustac	SIVmus	4	31
<i>Cercopithecus nictitans</i>	Singe hocheur	SIVgsn	6	47
<i>Cercopithecus mona</i>	Cercopithèque mona	SIVmon	1	1
<i>Cercopithecus albogularis</i>	Cercopithèque à diadème	SIVsyk	14	35
<i>Colobus guereza</i>	Colobe guéréza	SIVcol	9	9
<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandrill	SIVmnd-2	7	4
<i>Miopithecus ogouensis</i>	talapoin du nord	SIVtal	2	6
<i>Cercocebus atys</i>	mangabey enfumé	SIVsmm	9	7
<i>Cercocebus torquatus</i>	Cercocèbe à collier blanc	SIVrcm	2	0
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzé commun	SIVcpz	3	1
Total			63	144

Les derniers ont été collectés chez des cercopithèques à diadème de basses terres (*C. a. kibonotensis*) au sud du Kenya (près de Mombassa) et de cercopithèques à diadème de hautes terres (*C. albogularis kolbi*) au centre du Kenya (dans les environs de Nairobi). Ces singes ont été capturés par des primatologues de l'Institut de Recherche sur les Primates après accord des autorités Kenyanes, et relâchés dans la nature après le prélèvement d'un échantillon sanguin. Ces échantillons ont été ultérieurement testés avec des antigènes HIV-1/HIV-2 et des PCR ont été réalisées avec des amorces ciblant les gènes *pol* et *env*.

Sérums provenant de la viande de brousse et de primates domestiques. Pour les calculs de prévalences, 589 échantillons de primates supplémentaires provenant de différentes localités géographiques du Cameroun, incluant des marchés où est vendue la viande de brousse autour de la capitale Yaoundé, les concessions forestières et des villages au sud du pays ont été ajoutés. 265 provenaient d'une précédente étude sur la viande de brousse au Cameroun (304) et 324 ont été collectés plus récemment. Tous les échantillons sélectionnés devaient avoir un volume suffisant pour la réalisation de toutes les analyses sérologiques. Comme précédemment décrit, le sang était collecté sur les primates morts par ponction cardiaque et par ponction veineuse sur les animaux domestiques après administration d'un tranquillisant (304). Tous les prélèvements étaient effectués avec l'accord du Ministère Camerounais de l'environnement et de la forêt. Le plasma et les cellules étaient séparés sur place par centrifugation sur gradient de Ficoll. Tous les échantillons avaient été préalablement

testés par réaction croisée avec les antigènes HIV-1 et HIV-2 du test INNO-LIA HIV confirmation (Innogenetics, Gent, Belgique); mais aucune confirmation par PCR n'avait été faite.

Analyses de données. Les valeurs seuils (cut-off) pour chaque peptide V3 et chaque protéine rgp41 ont été déterminées en additionnant la densité optique moyenne de tous les échantillons de référence négatifs à 5 fois l'écart-type (99). Un échantillon pour lequel le ratio DO/cut-off était égal ou supérieur à 1 était considéré positif et celui ayant ce ratio inférieur à 1 considéré négatif. Pour chaque peptide V3 et chaque protéine rgp41, la sensibilité et la spécificité à détecter les anticorps du virus homologue ont été calculées. La sensibilité correspondant au nombre d'échantillons identifiés positifs divisé par le nombre total de positifs multiplié par 100 et la spécificité étant égale au nombre d'échantillons identifiés négatifs divisé par le nombre total de négatifs multiplié par 100. Les intervalles de confiance ont été calculés par la loi binomiale (Stata 7.0, Stata Corporation, College Station, Texas).

III. Résultats

ELISA spécifiques pour la détection des anticorps SIV. Dans une démarche logique de développement d'outils de diagnostic sérologiques spécifiques aux SIV, nous avons sélectionné 13 antigènes représentant les principales lignées SIV connues (304). Pour 11 de ces lignées, des protéines recombinantes de la région immunodominante de la gp41 connues comme étant hautement immunogènes et déjà utilisées pour la détection des anticorps HIV et SIV ont été produites (13, 149, 254, 255, 279, 339, 367). Parallèlement, nous avons aussi synthétisé des peptides de la boucle V3 pour 10 souches SIV, incluant les SIVlho et SIVagm pour lesquels les rgp41 n'étaient pas disponibles (Figure 19 et Tableau 3). Aussi bien les protéines rgp41 que les peptides V3 ont été évalués sur un panel de référence (confirmation par PCR) (Tableau 4). La Figure 21 montre les résultats de cette étude, avec les cut-off représentés en points rouges et dans l'ensemble un bruit de fond relativement faible pour les peptides comparés aux protéines rgp41.

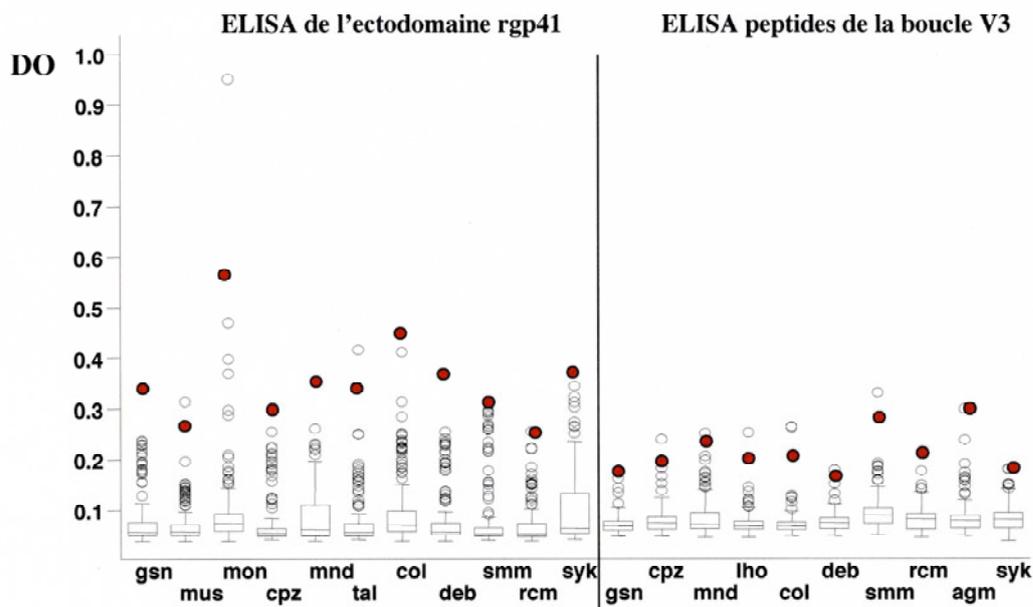


Figure 20. Evaluation des ELISA rgp41 (panel de gauche) et peptides V3 (panel de droite) sur les sérums non-infectés de primates non-humains (n=144). Les rectangles avec barre d'erreur représentent le 25ème [x_{25}] et le 75ème [x_{75}] centiles (ou intervalles interquartile, IQR) des DO de séro-réactivité pour chaque protéines rgp41 et peptide V3. Le milieu du rectangle représente la médiane ou le 50ème centile des données et les lignes émergent de chaque rectangle s'étendent aux valeurs adjacentes inférieures et supérieures. La valeur adjacente inférieure est définie comme le plus petit point de donnée supérieur ou égal à $x_{25} - 1,5 \times \text{IQR}$ et la valeur adjacente supérieure étant le plus grand point de donnée inférieur ou égal à $x_{75} + 1,5 \times \text{IQR}$. Les points sortant des valeurs adjacentes sont individuellement représentés par des cercles vides (Stata 7.0, Stata Corporation, College Station, Texas, USA). Les taches rouges représentent les valeurs des cut-off.

Le panel de sérums négatifs a été utilisé pour déterminer la spécificité des ELISA. Comme le montre les Tableaux 5a et 5b, aucun sérum négatif n'a réagi avec l'ELISA rgp41 correspondant (homologues), de même pour les peptides V3 à l'exception d'un sérum de

Tableau 5a. Sensibilité et spécificité des ELISA rgp41 SIV

Espèces	Détection d'anticorps homologues				détection d'anticorps homologues et hétérologues			
	Npos/Ntesté	Sensibilité	Npos/Ntesté	Spécificité	Npos/Ntesté	Sensibilité	Npos/Ntesté	Spécificité
<i>C. neglectus</i>	6/6	100.0%	0/3	100.0%	52/63	82.5%	0/144	100.0%
<i>C. cephus</i>	4/4	100.0%	0/31	100.0%	23/63	36.5%	1/144	99.3%
<i>C. nictitans</i>	6/6	100.0%	0/47	100.0%	35/63	55.6%	0/144	100.0%
<i>C. mona</i>	1/1	100.0%	0/1	100.0%	46/63	73.0%	1/144	99.3%
<i>C. albogularis</i>	14/14	100.0%	0/35	100.0%	41/63	65.1%	0/144	100.0%
<i>C. guereza</i>	9/9	100.0%	0/9	100.0%	37/63	58.7%	0/144	100.0%
<i>M. sphinx</i>	7/7	100.0%	0/4	100.0%	33/63	52.4%	0/144	100.0%
<i>M. agouensis</i>	1/2	50.0%	0/6	100.0%	44/63	69.8%	1/144	99.3%
<i>C. atys</i>	9/9	100.0%	0/7	100.0%	49/63	77.8%	0/144	100.0%
<i>C. torquatus</i>	2/2	100.0%	NT	-	28/63	44.4%	0/144	100.0%
<i>P. t. troglodytes</i>	3/3	100.0%	0/1	100.0%	21/63	33.3%	0/144	100.0%
Total	62/63	98.4%(91.5 – 100.0)^a	0/144	100.0%(97.9 – 100.0)^a	63/63	100.0%(95.4 – 100.0)^a	3/144	97.9%(94.0 – 99.6)^a

^a Intervalles de confiance à 95%.

Tableau 5b. Sensibilité et spécificité des ELISA V3 SIV

Espèces	détection d'anticorps homologues ^b				détection d'anticorps homologues et hétérologues ^c			
	Npos/Ntesté	Sensibilité	Npos/Ntesté	Spécificité	Npos/Ntesté	Sensibilité	Npos/Ntesté	Spécificité
<i>C. neglectus</i>	2/6	33.3%	0/3	100.0%	2/63	3.2%	1/144	99.3%
<i>C. cephus</i>	4/4	100.0%	0/31	100.0%	23/63	36.5%	1/144	99.3%
<i>C. nictitans</i>	5/6	83.3%	0/47	100.0%				
<i>C. mona</i>	1/1	100.0%	0/1	100.0%	16/63	25.4%	0/144	100.0%
<i>C. albogularis</i>	14/14	100.0%	0/35	100.0%	8/63	12.7%	2/144	98.6%
<i>C. guereza</i>	8/9	88.9%	0/9	100.0%	8/63	12.7%	0/144	100.0%
<i>M. sphinx</i>	7/7	100.0%	0/4	100.0%	6/63	9.5%	1/144	99.3%
<i>C. atys</i>	6/9	66.7%	1/7	85.7%	3/63	4.8%	0/144	100.0%
<i>C. torquatus</i>	1/2	50.0%	NT	-	14/63	22.2%	1/144	99.3%
<i>P. troglodytes</i>	2/3	66.7%	0/1	100.0%	1/63	1.6%	1/144	99.3%
-	NT	-	NT	-	3/63	4.8%	0/144	100.0%
-	NT	-	NT	-				
Total	50/61	82.0% (70.0 – 90.6)^a	1/138	99.3%(96.0 – 100.0)^a	51/63	81.0%(69.1 – 89.8)^a	7/144	95.1%(90.2 – 98.0)^a

^a Intervalles de confiance à 95%.

^b Les échantillons de talapoins (*M. agouensis*) ont été exclus de la détection homologue à cause de l'absence de peptide SIVtal.

^c Tous les 207 échantillons du panel de référence ont été testés avec tous les peptides.

^d SIVho et SIVagm ont été uniquement validés pour la détection d'anticorps hétérologues du fait de l'absence de sérums de référence correspondant aux infections par ces SIV.

mangabey enfumé qui a faiblement réagi avec le peptide SIVsmm V3. Ainsi, la spécificité globale pour la détection des anticorps homologues était de 100% pour les ELISA rgp41 et 99% pour les ELISA V3 (Tableaux 5a et 5b). Cependant, 3 des 144 sérums négatifs ont faiblement réagi (ratio DO/cut-off faible) avec les protéines hétérologues rgp41 et 6 autres ont réagi faiblement avec les ELISA V3 hétérologues (Tableaux 5a et 5b; 6a et 6b). Il est possible que des transmissions inter-espèces soient à l'origine de ces réactivités, mais tous ces sérums ont très faiblement réagi (ratio DO/cut-off inférieur à 1,65) et uniquement avec un seul antigène hétérologue. De plus, tous ces sérums étaient négatifs à leur antigène correspondant V3 et rgp41, suggérant fortement des réactions non-spécifiques. Ainsi, la spécificité globale pour la détection des anticorps homologues et hétérologues était de 98% pour les ELISA rgp41 et 95% pour les ELISA V3.

Pour déterminer la sensibilité des ELISA V3 et protéines rgp41, un panel de sérums positifs avec confirmation de l'infection à SIV par PCR a été analysé. Comme on peut le voir sur les Tableaux 5a et 5b, 62 des 63 échantillons ont fortement réagi avec les protéines rgp41 spécifiques à l'espèce, conduisant à une sensibilité globale de 98%. Le seul faux négatif obtenu était un échantillon de talapoin connu comme infecté par un SIVtal. Cependant, malgré cette non-détection par l'anticorps correspondant, cet échantillon a été identifié positif par d'autres protéines hétérologues rgp41 (SIVdeb, SIVsmm et SIVsyk) (Tableau 6a). Donc, si l'on prend en compte la réactivité des protéines rgp41 homologues et hétérologues, tous les sérums positifs ont été correctement identifiés. Ce qui n'était pas le cas pour les ELISA V3 (Tableau 5b). Dans l'ensemble, seulement 50 sur 61 positifs ont été identifiés correctement par les tests V3 homologues (82%) et cette sensibilité n'était pas affectée par la prise en compte des réactions hétérologues (Tableau 6b). Ainsi, bien qu'ayant la même spécificité, les ELISA V3 étaient moins sensibles pour la détection des anticorps homologues et hétérologues comparativement aux protéines rgp41.

Etendue des réactions croisées entre différents variants SIV. Afin d'estimer le nombre de tests spécifiques nécessaires pour une investigation optimale et logique sur le terrain, nous avons étudié l'étendue des réactions croisées des antigènes de chaque ELISA (peptides V3 et protéines rgp41) avec les sérums SIV positifs de primates d'espèce différente. Ces données sont réunies dans les Tableaux 6a et 6b. Dans l'ensemble, les ELISA rgp41 croisaient considérablement plus que les peptides V3. Par exemple, l'ELISA rgp41 SIVmon détectait toutes les infections à SIVmus, SIVgsn, SIVcpz, SIVmnd2 et SIVsyk, et l'ELISA rgp41 SIVsmm identifiait toutes les infections SIVdeb, SIVtal et SIVsyk (Tableau 6a).

Tableau 6a. Réactions croisées des ELISA rgp41 spécifiques aux lignées SIV avec les sérums de différentes espèces de primates. Les sérums de référence SIV positifs et négatifs de différentes espèces de primates (panel de gauche) ont été testés avec 11 ELISA rgp41 différents (panel de droite). Les ELISA homologues sont encadrés.

Espèces	Sérums de primates	N testé(s)	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
			SIVgsn Npos/ Ntesté(s)	SIVmus Npos/ Ntesté(s)	SIVmon Npos/ Ntesté(s)	SIVcpz Npos/ Ntesté(s)	SIVmnd-2 Npos/ Ntesté(s)	SIVtal Npos/ Ntesté(s)	SIVcol Npos/ Ntesté(s)	SIVdeb Npos/ Ntesté(s)	SIVrcm Npos/ Ntesté(s)	SIVsmm Npos/ Ntesté(s)	SIVsyk Npos/ Ntesté(s)
<i>C.neglectus</i>	anticorps SIVdeb neg	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>C.neglectus</i>	anticorps SIVdeb pos	6	1/6	0/6	3/6	0/6	2/6	4/6	2/6	6/6	0/6	6/6	5/6
<i>C.guereza</i>	anticorps SIVcol neg	9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
<i>C.guereza</i>	anticorps SIVcol pos	9	1/9	5/9	3/9	1/9	0/9	1/9	9/9	2/9	0/9	0/9	0/9
<i>M.ogouensis</i>	anticorps SIVtal neg	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>M.ogouensis</i>	anticorps SIVtal pos	2	1/2	1/2	1/2	1/2	0/2	1/2	0/2	2/2	1/2	2/2	2/2
<i>M.sphinx</i>	anticorps SIVmnd-2 neg	4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>M.sphinx</i>	anticorps SIVmnd-2 pos	7	6/7	2/7	6/6(1nt)*	1/7	7/7	5/7	7/7	7/7	5/7	7/7	5/7
<i>C.nictitans</i>	anticorps SIVgsn neg	47	0/47	1/47	1/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47
<i>C.nictitans</i>	anticorps SIVgsn pos	6	6/6	5/6	6/6	4/6	1/6	3/6	2/6	4/6	0/6	3/6	4/6
<i>C.cephus</i>	anticorps SIVmus neg	31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31
<i>C.cephus</i>	anticorps SIVmus pos	4	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	2/4	4/4	4/4	1/4	4/4	1/4
<i>C.mona</i>	anticorps SIVmon neg	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C.mona</i>	anticorps SIVmon pos	1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
<i>P.troglodytes</i>	anticorps SIVcpz neg	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>P.troglodytes</i>	anticorps SIVcpz pos	3	3/3	2/3	3/3	3/3	0/3	2/3	0/3	2/3	0/3	1/3	0/3
<i>C.atys</i>	anticorps SIVsmm neg	7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
<i>C.atys</i>	anticorps SIVsmm pos	9	3/9	2/9	5/9	3/9	8/9	9/9	4/9	9/9	8/9	9/9	9/9
<i>C.torquatus</i>	anticorps SIVrcm pos	2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	0/2	1/2	2/2	2/2	0/2
<i>C.albogularis</i>	anticorps SIVsyk neg	35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35
<i>C.albogularis</i>	anticorps SIVsyk pos	14	9/14	1/14	14/14	4/14	14/14	14/14	8/14	14/14	11/14	14/14	14/14

* nt, non testé(s)

45

Tableau 6b. Réactions croisées des ELISA V3 spécifiques aux lignées SIV avec les sérums de différentes espèces de primates. Les sérums de référence SIV positifs et négatifs de différentes espèces de primates (panel de gauche) ont été testés avec 10 ELISA V3 différents (panel de droite). Les ELISA homologues sont encadrés.

Espèces	Sérums de primates	N testé(s)	ELISA								
			SIVgsn Npos/ Ntesté(s)	SIVcpz Npos/ Ntesté(s)	SIVmnd Npos/ Ntesté(s)	SIViho Npos/ Ntesté(s)	SIVcol Npos/ Ntesté(s)	SIVdeb Npos/ Ntesté(s)	SIVrcm Npos/ Ntesté(s)	SIVsmm Npos/ Ntesté(s)	SIVagm Npos/ Ntesté(s)
<i>C.neglectus</i>	anticorps SIVdeb neg	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>C.neglectus</i>	anticorps SIVdeb pos	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	0/6	0/6	0/6
<i>C.guereza</i>	anticorps SIVcol neg	9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
<i>C.guereza</i>	anticorps SIVcol pos	9	0/9	2/9	0/9	1/9	8/9	0/9	0/9	0/9	0/9
<i>M.ogouensis</i>	anticorps SIVtal neg	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>M.ogouensis</i>	anticorps SIVtal pos	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2
<i>M.sphinx</i>	anticorps SIVmnd-2 neg	4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>M.sphinx</i>	anticorps SIVmnd-2 pos	7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	2/7	0/7	1/7
<i>C.nictitans</i>	anticorps SIVgsn neg	47	0/47	1/47	0/47	0/47	1/47	0/47	0/47	0/47	0/47
<i>C.nictitans</i>	anticorps SIVgsn pos	6	5/6	5/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>C.cephus</i>	anticorps SIVmus neg	31	0/31	0/31	0/31	1/31	0/31	1/31	0/31	0/31	0/31
<i>C.cephus</i>	anticorps SIVmus pos	4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>C.mona</i>	anticorps SIVmon neg	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C.mona</i>	anticorps SIVmon pos	1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>P.troglodytes</i>	anticorps SIVcpz neg	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>P.troglodytes</i>	anticorps SIVcpz pos	3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>C.atys</i>	anticorps SIVsmm neg	7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7
<i>C.atys</i>	anticorps SIVsmm pos	9	2/7	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	6/9	3/9
<i>C.torquatus</i>	anticorps SIVrcm pos	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2
<i>C.albogularis</i>	anticorps SIVsyk neg	35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35
<i>C.albogularis</i>	anticorps SIVsyk pos	14	9/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	14/14

46

Par contre, seuls les peptides V3 SIVgsn et SIVcpz détectaient un nombre appréciable d'anticorps hétérologues, bien que pour la plupart appartenant à des virus proches (Tableau 6b et Figure 19). Tous les autres ELISA V3 détectaient très peu, voire pas du tout d'anticorps hétérologues. Comme précédemment rapportés, ces résultats montrent que les anticorps dirigés contre la V3 sont plus spécifiques à l'espèce et donc, plus appropriés pour différencier les lignées SIV que les anticorps dirigés contre la gp41 (254, 279, 367). Dans l'ensemble, les ELISA rgp41 SIVdeb, SIVsmm, SIVmon et SIVtal croisaient plus que les autres, détectant respectivement 80%, 74%, 72% et 70% des infections SIV hétérologues. Par contre, les ELISA rgp41 SIVmus et SIVcpz croisaient moins que tous les autres, identifiant environ 30% des infections SIV hétérologues. Au niveau des espèces, les sérums de cercopithèques à diadème infectés réagissaient avec le plus grand nombre d'ELISA, alors que ceux des colobes guéréza infectés réagissaient avec moins d'ELISA rgp41 hétérologues. En effet, 3 sérums de colobes guéréza SIVcol positifs ont réagi seulement avec leur ELISA rgp41. Et enfin, les DO des ELISA étaient plus élevées pour les réactivités homologues comparées aux hétérologues.

Bien que la majorité des ELISA rgp41 aient une forte capacité de croisement, l'étendue et la direction de ces croisements étaient variables. Par exemple, l'ELISA rgp41 SIVdeb a identifié tous les sérums de mandrills, cercopithèques à diadème, talapoins, mangabeys enfumés et moustacs, mais l'inverse n'était vrai que pour l'ELISA rgp41 SIVsmm. Les ELISA rgp41 SIVmnd2, SIVsyk, SIVtal et SIVmus n'ont respectivement identifié que 2/6, 5/6, 4/6 et 0/6 des sérums positifs de singe de Brazza. Similairement, l'ELISA rgp41 SIVcol a détecté tous les sérums positifs de moustacs et de cercopithèques mona, mais seulement 2 des 6 sérums positifs de singes hocheurs; les quatre autres restant non-détectés malgré le fait que singes hocheurs, moustacs et cercopithèques mona soient tous porteurs de virus génétiquement très proches (Figure 19). Enfin, l'ELISA rgp41 SIVtal n'a identifié qu'un seul sérum talapoin positif, mais a détecté 43 des 61 échantillons positifs (70%) appartenant à d'autres espèces. Ainsi, bien que les anticorps spécifiques aux espèces croisaient fréquemment avec les protéines rgp41 des SIV infectant d'autres espèces, l'étendue et la direction de ces croisements étaient imprévisibles et pas toujours en concordance avec les relations phylogénétiques des souches SIV concernées.

Prévalence des infections à SIV dans différentes espèces de primates. Après leur validation, les tests ELISA nouvellement développés ont été utilisés pour déterminer la prévalence de l'infection à SIV dans 9 espèces de primates vivant au Cameroun. Les échantillons avaient été collectés dans différentes régions représentant différents habitats de

primates dans tout le sud Cameroun. Tous les échantillons (n = 722) ont été testés avec les protéines rgp41 homologues et hétérologues, et seulement quelques cas sélectionnés (sérums) ont été testés avec les peptides V3. Tous les sérums ont aussi été testés avec l'INNO-LIA pour comparer les résultats obtenus avec les tests SIV spécifiques rgp41 avec ceux obtenus par croisement avec les antigènes HIV.

Le Tableau 7 résume la proportion des sérums positifs aux ELISA rgp41 SIV pour les membres de 6 espèces de primates chez lesquels une infection par un SIV a déjà été génétiquement caractérisée (50, 97, 98, 230, 371). Les résultats indiquent une surprenante variation de la prévalence des infections naturelles à SIV. Les mandrills exhibaient la plus forte prévalence, avec un animal infecté sur deux. Des prévalences intermédiaires étaient observées chez les singes de Brazza et colobes guéréza, avec respectivement 39% et 27% des animaux infectés. Par contre, cette prévalence était relativement faible pour les talapoins (11%), les moustacs (4%) et les singes hocheurs (3%), malgré le nombre assez important d'échantillons testés pour les deux dernières espèces (respectivement 203 et 193 échantillons).

Nous avons par la suite comparé les résultats obtenus avec les ELISA SIV spécifiques à ceux obtenus par réactions croisées avec les protéines HIV-1 et HIV-2 du test INNO-LIA et déterminé les degrés de discordances. Cette analyse a donné des résultats très différents en fonction de l'espèce considérée. Pour les singes de Brazza, l'ELISA rgp41 SIVdeb a identifié le même nombre de sérums positifs que l'INNO-LIA (100% de concordance). Pour les mandrills, 14/27 sérums étaient positifs à l'ELISA rgp41 SIVmnd2, contre 15/27 pour l'INNO-LIA. Les analyses par PCR n'ont pas confirmé une infection à SIVmnd2 dans l'échantillon discordant, suggérant une absence d'infection. Ainsi, à l'exception de cette détection non-spécifique de l'INNO-LIA, les deux test ont donné des résultats comparables. Cependant, la situation était différente pour les colobes guéréza. Seulement 8 sur 14 sérums ELISA SIVcol positifs étaient aussi identifiés positifs par l'INNO-LIA. Deux des sérums discordants étaient positifs à l'ELISA V3 SIVcol et 2 autres ont été confirmés par PCR (données non présentées). Donc, pour les colobes guéréza, le test INNO-LIA sous-estimait clairement le taux d'infection. Le cas inverse a été observé pour les talapoins dont 1 seul sérum sur 26 était identifié positif par l'ELISA rgp41 SIVtal, alors que 3/26 l'étaient pour l'INNO-LIA. Ces 3 sérums ont été aussi identifiés positifs par les protéines hétérologues SIVdeb, SIVsmm et SIVsyk et ont été confirmés par PCR (230, 304). Ainsi, pour les talapoins, le test INNO-LIA était plus fiable que l'ELISA rgp41 spécifique au SIVtal.

Tableau 7. Prévalences des infections naturelles à SIV chez les primates vivant au Cameroun

Espèces	SIV	INNO-LIA HIV-1/2		SIV rgp41 ELISA		Prévalences SIV ^a (95% CI)
		Npos/Ntesté(s)	Détection d'anticorps homologues Npos/Ntesté(s)	Détection d'anticorps hétérologues Npos/Ntesté(s)	Détection d'anticorps hétérologues Npos/Ntesté(s)	
<i>Cercopithecus neglectus</i>	SIVdeb	9/23	9/23	9/23	9/23	39.1% (19.7 – 61.5)
<i>Mandrillus sphinx</i>	SIVmnd-2	15/27	14/27	14/27	13/27	51.8% (31.9 – 71.3)
<i>Colobus guereza</i>	SIVcol	8/52	14/52	14/52	8/52	26.9% (15.6 – 41.0)
<i>Miopithecus ogouensis</i>	SIVtal	3/26	1/26	1/26	3/26 ^b	11.5% (2.4 – 30.2)
<i>Cercopithecus cephus</i>	SIVmus	77/203	6/203	6/203	6/203	2.9% (1.1 – 6.3)
<i>Cercopithecus nictitans</i>	SIVgsn	33/193	8/193	8/193	8/193	4,1% (1.8 – 8.0)
<i>Cercopithecus pogonias</i>	– ^c	19/70	NT	NT	(1)/70 ^d	0% ^f (0.0 – 4.2)
<i>Cercocebus agilis</i>	SIVagl ^e	27/92	NT	NT	(1)/92 ^d	0% ^f (0.0 – 3.2)
<i>Lophocebus albigena</i>	– ^c	20/36	NT	NT	0/36	0% (0.0 – 8.0)

^a Les prévalences SIV ont été calculées en combinant les résultats des détecteurs d'anticorps homologues et hétérologues obtenus avec les différents ELISA rgp41

^b Deux échantillons de *M. ogouensis* ont été identifiés positifs par les ELISAs hétérologues SIV rgp41 et l'infection SIVtal a été confirmée pour les deux par PCR et séquençage

^c L'infection à SIV n'a pas encore été confirmée par amplification d'une séquence

^d Les uniques cas de réactivité observés sont vraisemblablement non-spécifiques (voir les détails dans le texte)

^e Une séquence partielle *pol* très proche du SIVcrim a été amplifiée chez deux agilis en captivité (voir les détails dans le texte)

^f Les intervalles de confiance ont été calculés en supposant le nombre de positifs égal à zéro parmi les sérums testés

La plus importante différence entre les deux tests était observée chez les moustacs et les singes hocheurs. Chez les moustacs, seuls 6/203 échantillons étaient positifs à l'ELISA rgp41 SIVmus, contre 77/203 pour l'INNO-LIA. De même, chez les singes hocheurs, seuls 8/193 sérums étaient positifs à l'ELISA rgp41 SIVgsn contre 33/193 pour le LIA. Néanmoins, tous les sérums de singes hocheurs et moustacs positifs à l'ELISA rgp41 l'étaient aussi en LIA. Des analyses supplémentaires ont montré que tous les positifs aux ELISA SIVmus et SIVgsn l'étaient aussi avec les ELISA rgp41 hétérologues (Tableau 7) et la grande majorité l'était par PCR. Par contre, aucun des sérums discordants positifs à l'INNO-LIA n'a réagi avec les protéines rgp41 des autres espèces et aucun n'a été confirmé positif par PCR.

Confirmation par western blot. Afin de vérifier si les échantillons discordants INNO-LIA positifs résultaient d'un manque de fiabilité de l'INNO-LIA ou plutôt reflétaient certaines caractéristiques d'un virus présent mais non-identifiable par les ELISA rgp41 et V3, nous avons développé un western blot spécifique au SIVgsn, donc aux virus de la lignée SIVgsn/mus/mon (Figure 19). La Figure 21 montre les profils western blot de trois groupes d'échantillons testés: les sérums de singes hocheurs et moustacs positifs aux ELISA SIV et à l'INNO-LIA (à gauche); négatifs aux ELISA mais positifs à l'INNO-LIA (au milieu); et négatifs pour les deux tests (à droite). Des anticorps anti-SIV n'ont été identifiés que chez les sérums positifs au LIA et aux ELISA SIV: trois sérums de singes hocheurs et 3 sérums de moustacs ont fortement réagi avec les protéine de surface gp120 et gp160. Quatre de ces sérums ont aussi réagi avec la glycoprotéine transmembranaire (gp41) et 3 croisaient avec la protéine Gag p24 du HIV-1. Par contre, tous les autres sérums incluant 5 qui réagissaient fortement avec la gp120 HIV-1 de l'INNO-LIA (S1079), la gp41 (S43, S1267) et la p17 (S1285, S1287) (données non présentées), n'ont réagi ni avec les protéines SIVgsn, ni avec celles du HIV-1 de l'immunoblot. Donc, les discordants INNO-LIA positifs représentaient bien des réactions non spécifiques.

Recherche de SIV chez les primates suspectés d'infection par le LIA, mais négatifs en PCR, avec les nouveaux ELISA SIV spécifiques. Pour finir, nous avons utilisé les ELISA rgp41 nouvellement développés pour analyser des sérums provenant de 92 cercocèbes agiles (*Cercocebus agilis*), 70 cercopithèques pogonias (*Cercopithecus pogonias*) et 36 mangabeys à joues grises (*Lophocebus albigena*) pour la détection croisée des anticorps SIV. Il a déjà été rapporté que les sérums de ces trois espèces croisent avec les antigènes HIV-1 et HIV-2, suggérant la présence dans ces espèces de SIV non encore identifiés (304). De plus, des virus

proches du SIVrcm ont été identifiés par PCR de l'intégrase chez deux cercocèbes agiles en captivité (280). Nous avons donc vérifié si notre panel d'ELISA SIV spécifiques permettrait l'identification de SIV chez ces espèces.

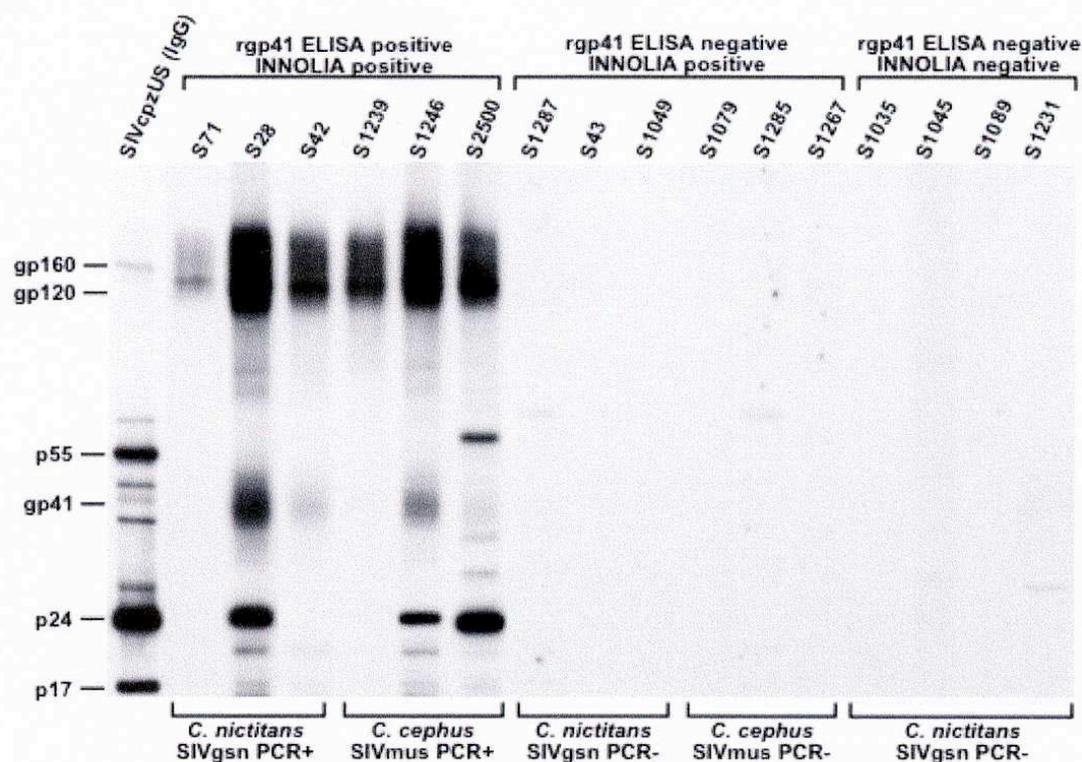


Figure 21. Western blot SIVgsn spécifique. Des anticorps SIV spécifiques sont seulement détectés dans les sérums simultanément positifs en ELISA rgp41 SIV et INNO-LIA. Chaque bandelette contient 100 ng de protéine Gag p24. Les positions de l'enveloppe du SIVgsn (gp160, gp120 et gp41) et des protéines Gag du HIV-1 (p55, p24 et p17) sont indiquées à gauche de la figure. La première bande montre la réactivité d'un contrôle SIVcpz positif (IgG SIVcpzUS spécifiques purifiés, 1 µg/ml).

Nous avons précédemment identifié 66/198 sérums positifs par l'INNO-LIA. Cependant, en utilisant le set complet des antigènes rgp41, seul deux sérums ont positivement réagi sur les 198. Un sérum de cercocèbe agile a réagi avec la protéine rgp41 SIVcol et l'autre appartenant à un mangabey à joues grises a faiblement réagi avec la protéine rgp41 SIVsyk. Dans les 2 cas, la réactivité était limitée à un seul antigène rgp41 et toutes les tentatives de confirmation par PCR étaient négatives. De même, seulement 7/198 sérums ont faiblement réagi avec les ELISA V3 et aucun des 7 n'était ni positif à un antigène rgp41, ni aux analyses PCR. Enfin, aucun des 66 sérums INNO-LIA positifs n'a réagi avec les ELISA rgp41 SIV spécifiques et aucun ne contenait de séquences amplifiables. En considérant toutes ces données, les ELISA SIV spécifiques n'ont pu mettre en évidence l'existence d'une infection SIV chez les cercocèbes agiles, les cercopithèques pogonias et les mangabeys à joues grises étudiés.

IV. DISCUSSION

Bien qu'il soit actuellement bien établi qu'une proportion assez importante de singes vivant dans la nature en Afrique subsaharienne est porteuse d'un SIV, aucune étude n'a jusqu'à présent évalué l'étendue de cette infection chez les différentes espèces naturellement infectées, si certaines espèces étaient des réservoirs sources pour d'autres et si les virus couramment reconnus représentaient la totalité des infections dans la nature. Dans cette étude, nous décrivons le développement et la validation d'un panel de tests spécifiques à la détection des anticorps SIV et son utilisation pour la détermination des prévalences dans 9 espèces de primates. Les résultats révèlent des différences de prévalence inattendues, avec de très fortes prévalences pour certaines espèces et des taux beaucoup plus faibles pour d'autres. Ces résultats montrent que l'épidémiologie des infections à SIV dans la nature est plus complexe que précédemment considérée et que les différents hôtes primates non-humains ont des susceptibilités variables à l'infection par SIV.

Développement des outils de diagnostic et stratégies d'analyse. Les peptides synthétiques ont été utilisés dans le passé pour détecter les anticorps anti-HIV et SIV chez les humains et les primates (31, 32, 254, 255, 279, 367, 378). Cependant, les peptides utilisés couvrent très souvent de trop courts épitopes et ne sont pas particulièrement sensibles comme antigènes de capture, à moins d'accroître leur efficacité par des modifications appropriées. De plus, des anticorps dirigés contre des épitopes différents de quelques acides aminés pourraient ne pas être détectés. Afin de générer un panel de tests de détection d'anticorps assez robuste, nous avons développé des stratégies ELISA qui utilisent aussi bien des peptides que des protéines recombinantes comme antigènes de capture. Pour l'élaboration des peptides, nous avons sélectionné la région V3 de l'enveloppe SIV, car cette région est connue pour induire des anticorps permettant une différenciation des infections SIV/HIV (279, 367). Pour les protéines recombinantes, nous avons exprimé une partie de la gp41 hautement immunogène qui comprend aussi bien les épitopes linéaires que ceux ayant une conformation secondaire ou tertiaire (38, 428, 436).

La sensibilité et la spécificité des tests nouvellement développés ont été déterminées sur un panel de sérums correctement caractérisés. Ces analyses ont montré à l'exception d'un échantillon, 100% de sensibilité et 100% de spécificité pour les ELISA rgp41 (Tableau 5a et 5b). De plus, nous avons observé la forte capacité de croisement des ELISA rgp41, bien qu'il soit impossible de prédire la direction et l'étendue de ces croisements qui varient en fonction

du test et de l'espèce du primate. Les peptides V3 étaient moins sensibles, mais capables de discriminer entre les différentes lignées SIV. Ce panel d'ELISAs rgp41 et peptides V3 était donc fiable et valable pour la détection des anticorps anti-SIV.

Bien que la combinaison des ELISA rgp41 SIVmon, SIVsmm et SIVcol puisse être suffisante pour l'identification correcte de toutes les infections SIV dans le panel de référence, le nombre de sérums positifs dans ce panel pour chacune des 11 espèces reste limité (Tableau 4). Donc, les futures surveillances sérologiques chez les primates devraient utiliser la totalité du panel des ELISA rgp41, particulièrement dans les espèces chez lesquelles aucune infection à SIV n'a encore été confirmée. Nous espérons que les vrais positifs réagiront avec les protéines rgp41 homologues et hétérologues, et aussi bien avec les peptides V3 sélectionnés si la sensibilité de ces derniers est améliorée (254, 279, 367). Au fur et à mesure que de nouveaux SIV seront identifiés et caractérisés, il sera possible d'identifier les profils sérologiques fortement prédictifs d'une infection, même en l'absence de confirmation par PCR. Dans ce contexte, il sera très important d'améliorer la sensibilité de l'ELISA rgp41 SIVtal par l'expression et l'évaluation de nouvelles protéines immunodominantes rgp41 SIVtal et en examinant la diversité génétique et antigénique de la gp41 pour différentes souches SIVtal. Enfin, l'ajout des protéines rgp41 SIVlho, SIVmnd-1 et SIVagm assurera la représentativité de toutes les lignées SIV dans le panel d'ELISA rgp41.

Les tests ELISA développés dans ce travail sont des ELISA "indirect" dans lesquels les anticorps recherchés (anticorps anti-SIV dans ce cas) se fixent sur les antigènes que nous avons développés et fixés dans des plaques, et le complexe antigène-anticorps est révélé par une anti-globuline humaine anti-IgG marquée par une enzyme. L'efficacité de ce système "indirect" est démontré dans la recherche des anticorps anti-HIV chez l'homme, mais l'utilisation des anti-globulines humaines pour l'identification des immunoglobulines des primates non-humains pourrait être perturbée par des variations d'épitopes. Cette variation d'épitopes entre humains et primates non-humains pourrait expliquer la non-détection d'un talapoin SIV-positif par l'ELISA SIVtal rgp41, mais reste très discutable dans la mesure où un talapoin positif a été correctement identifiés par cet ELISA, et tous les autres petits singes aussi éloignés de l'humain que le talapoin ont été correctement identifiés par l'ELISA rgp41. Les ELISA "indirect" sont néanmoins caractérisés par un manque de spécificité, les immunoglobulines non spécifiques pouvant se fixer sur le support solide et être révélées par l'anti-globuline marqué. Nos ELISA rgp41 sont très sensibles pour la détection des anticorps anti-SIV, mais manquent de spécificité pour leur utilisation dans la recherche des anticorps anti-SIV chez l'homme. Des systèmes ELISA "Sandwich" et "immunocapture" qui sont très

sensibles et d'excellente spécificité pourraient être développés dans cette optique. D'autre part, la révélation des réactions n'étant pas faite par une anti-globuline, mais par un antigène marqué, ces systèmes permettraient de résoudre d'éventuels problèmes liés à la variabilité des épitopes des immunoglobulines entre espèces. Enfin, les systèmes ELISA par "compétition" qui utilisent la différence d'affinité pour un antigène entre un anticorps anti-virus du patient et un anticorps anti-virus marqué par une enzyme représentent une dernière alternative, mais sont limités par leur extrême spécificité qui dans le cas des infections à SIV limiterais énormément les chances de détection des anticorps anti-SIV, dans la mesure où ils ne détectent déjà pas ou assez mal les souches HIV-1 O et HIV-2. Les ELISA V3 étant déjà hautement spécifiques et permettant d'identifier les lignées virales, l'utilisation des systèmes ELISA par "compétition" n'est pas indispensable. Il serait plus judicieux d'améliorer la sensibilité des ELISA V3.

Réactions croisées HIV comme prédateur de l'infection à SIV. La majorité des lignées SIV connue à cette date a été initialement identifiée parce que les primates hôtes avaient des anticorps croisant avec les antigènes HIV-1 et/ou HIV-2 (45, 50, 51, 95-97, 122, 140, 149, 291, 295, 304, 371, 384). Dans la mesure où les tests commercialisés pour le dépistage de l'infection à HIV ne contiennent qu'un nombre limité d'antigènes, la majorité des études a utilisé des tests type western blot pour rechercher des anticorps anti-SIV. L'un de ces tests, l'INNO-LIA HIV confirmation, a prouvé son efficacité dans l'identification de divers variants SIV. Ce test qui contient des protéines recombinantes HIV-1 et HIV-2 et des peptides synthétiques fixés en fines bandes discrètes sur bandelette de nylon a permis l'identification correcte de 7 des 13 principales lignées SIV connues (50, 95-98, 304). Vu ses performances, nous avons examiné l'efficacité de l'INNO-LIA à déterminer les prévalences des infections à SIV dans différentes espèces de primates.

Pour déterminer le degré de croisement de l'INNO-LIA, nous avons comparé les proportions de sérums positifs identifiés par l'INNO-LIA et celles des ELISA SIV dans le panel de 722 sérums testés. Les résultats ont montré des différences remarquables en fonction des espèces testées. Pour les singes de Brazza, mandrills, talapoins, cercopithèques à diadème et mangabeys enfumés, les performances de l'INNO-LIA et des ELISA SIV étaient relativement similaires (Tableau 7). Par contre, pour les colobes gueréza, l'INNO-LIA n'a pas identifié 40% des animaux infectés probablement à cause de la forte divergence des SIVcol dans l'enveloppe par rapport aux autres SIV (Figure 19) et le faible niveau de croisement des anticorps anti-SIVcol (Tableau 6a) (279). Cependant, le cas le plus flagrant

reste la discordance des résultats obtenus pour les singes hocheurs et les moustacs (Tableau 7). Afin d'exclure la possibilité que certains membres de ces deux espèces n'aient pas assez d'anticorps contre les antigènes des ELISA SIV utilisés, nous avons testé certains échantillons pour leur réactivité avec des virions HIV contenant l'enveloppe du SIV_{gsn} (Figure 21). Aucun sérum ELISA négatif n'a été identifié positif, alors que les sérums ELISA positifs réagissaient avec l'enveloppe SIV_{gsn} et la p24 HIV-1 (Figure 21). De plus, aucun des sérums discordants n'a été confirmé positif par PCR ou réagi avec les protéines SIV rgp41 hétérologues. Au vu de ces résultats, nous avons conclu que la réactivité de ces sérums de singes hocheurs et moustacs à l'INNO-LIA reflétait des réactions non-spécifiques et cela peut aussi s'appliquer aux cercocèbes agiles, aux cercopithèques pogonias et aux mangabeys à joues grises (Tableau 7). Il reste à déterminer si ces réactions non-spécifiques sont dirigées contre des produits des gènes HIV ou des protéines contenues dans le test INNO-LIA. Dans tous les cas, il est clair que l'INNO-LIA surestime les prévalences des infections SIV chez certaines espèces de primates, et que les tests basés sur les antigènes HIV ne sont pas appropriés à la détermination des prévalences SIV chez les primates ou pour l'identification des infections à SIV chez les humains (245).

Prévalences variables de l'infection SIV chez les différentes espèces de primates naturellement infectés. Des prévalences élevées ont été observées chez la grande majorité des espèces de primates connues comme porteuses d'un SIV. Les espèces les plus étudiées à ce jour, mangabeys enfumées et singes verts d'Afrique, ont des prévalences qui excèdent fréquemment 50% chez les animaux adultes aussi bien en captivité que dans la nature (26, 51, 194, 312). De fortes prévalences ont aussi été rapportées chez les mandrills, les singes de Brazza et les cercopithèques à diadème vivant dans la nature, bien que le nombre d'animaux testés soit souvent limité (50, 121, 371, 384). Ces données ont été généralisées et l'infection à SIV a été considérée largement répandue chez les primates non-humains. Nous avons trouvé des prévalences de 3% et 4% pour l'infection à SIV chez les singes hocheurs et les moustacs respectivement, prouvant de ce fait que cette prévalence est variable d'une espèce à l'autre.

Les raisons de ces variations de taux d'infection chez différentes espèces de primates ne sont pas connues, mais sont vraisemblablement dus à des combinaisons de facteurs viraux, hôtes et/ou environnementaux. Par exemple, les SIV_{gsn} et SIV_{mus} pourraient représenter des infections à SIV récemment acquises et donc pas encore assez adaptées pour une réplication et une propagation efficaces chez leurs nouveaux hôtes. Alternativement, des différences comportementales pourraient à un certain degré limiter l'étendue de l'exposition au virus chez

les singes hocheurs et les moustacs par rapport aux autres espèces. Les échantillons identifiés positifs aux SIV_{gsn} et SIV_{mus} ont été collectés dans diverses régions géographiques au Cameroun, excluant la possibilité d'un biais d'échantillonnage comme raison de la faible prévalence. Les propriétés intrinsèques des virus et/ou le comportement des primates jouent probablement un rôle dans la transmission et la persistance des infections à SIV chez les primates dans la nature. Des études récentes montrent que les facteurs génétiques de l'hôte seraient également impliqués dans ces processus. En effet, un nombre de mécanismes intrinsèques de défense de l'hôte a été récemment décrit (54, 150, 362, 380) et de tels facteurs de restriction pourraient fortement influencer la susceptibilité des primates aux SIV de leur ou des autres espèces. La maîtrise de ces facteurs de l'hôte, de même que leur mécanisme d'action permettra une meilleure compréhension de l'épidémiologie et de l'histoire naturelle des différents SIV, mais aussi d'apprécier leur capacité de transmission à l'homme.

Enfin, nous avons utilisé les tests de détection nouvellement développés pour tester les espèces suspectées naturellement infectées par un SIV, mais pas encore confirmés (cercocèbes agiles, cercopithèques pogonias et mangabeys à joues grises). Bien qu'un nombre relativement important de sérums ait été identifié positif par l'INNO-LIA, aucune évidence d'infection SIV n'a été trouvée avec les ELISA SIV. Ce résultat est particulièrement conflictuel dans la mesure où 2/20 cercocèbes agiles en captivité ont été récemment rapportés comme porteurs d'un virus proche du SIV_{rcm} (280). Notre panel d'ELISA inclus à la fois des protéines rgp41 et peptides V3 SIV_{rcm}; cependant, aucun cercocèbe agile sur 92 n'a réagi avec ces antigènes, suggérant l'absence d'anticorps anti-Env SIV_{rcm}. Il est possible que le SIV_{agi} soit un recombinant contenant une séquence 5' proche du SIV_{rcm} et une partie 3' d'un virus hautement divergent. Alternativement, la prévalence du SIV_{agi} dans la nature pourrait être extrêmement faible. Des études sont nécessaires pour vérifier ces hypothèses et déterminer si les cercocèbes agiles, les cercopithèques pogonias et les mangabeys à joues grises sont porteurs de SIV trop divergents pour être détectés par les tests spécifiques courants.

Recherche des infections à SIV chez les humains. Vu l'importance des réservoirs SIV existants, des études sont nécessaires pour déterminer si des transmissions de lentivirus autres que le SIV_{cpz} et le SIV_{sm} ont eu lieu dans les régions où les infections à SIV chez les primates non-humains sont prévalentes. Dans cette étude, nous avons décrit des tests de diagnostic capables d'identifier une grande diversité de SIV chez les primates non-humains. Ces mêmes outils devraient pouvoir s'utiliser chez les groupes humains à risque,

fréquemment exposés au sang et autres tissus de primates infectés. Dans ce contexte, il est important de noter que nous avons exploré aussi bien les stratégies de dépistage que celles de confirmation. En particulier, nous avons montré que des gènes codants optimisés SIVgsn *env* pouvaient être utilisés pour générer des pseudovirions contenant suffisamment de glycoprotéine d'enveloppe SIVgsn (Figure 21). Des stratégies identiques peuvent être utilisées pour générer des pseudovirions SIV/HIV pour toutes les autres souches SIV connues. En l'absence d'isolats compétents en répllication, indisponibles pour la plupart des lignées SIV, cette stratégie est celle qui confirmerait le mieux la présence des anticorps spécifiques à l'enveloppe (gp160, gp120 et gp41) dans des sérums réagissant avec les ELISA rgp41. Documenter de tels anticorps dans des sérums humains suggérerait fortement une infection à SIV, même en absence de séquences virales amplifiables par PCR.

V. Publication

Un article décrivant cette stratégie de développement et de validation d'outils de diagnostic des SIV a été publié dans *Virology*.

Aghokeng AF, Liu W, Bibollet-Ruche F, Loul S, Mpoudi-Ngole E, Laurent C, Mwenda JM, Langat DK, Chege GK, McClure HM, Delaporte E, Shaw GM, Hahn BH, Peeters M. 2005. Widely varying SIV prevalence rates in naturally infected primate species from Cameroon. *Virology* **345**(1):174-189.

Widely varying SIV prevalence rates in naturally infected primate species from Cameroon

Avelin F. Aghokeng^{a,b}, Weimin Liu^c, Frederic Bibollet-Ruche^c, Severin Loul^d, Eitel Mpoudi-Ngole^d, Christian Laurent^{a,b}, Jason M. Mwenda^e, Daudi K. Langat^e, Gerald K. Chege^e, Harold M. McClure^f, Eric Delaporte^{a,b}, George M. Shaw^g, Beatrice H. Hahn^c, Martine Peeters^{a,b,*}

^a Laboratoire Retrovirus, UMR145, IRD, Institute for Research and Development, Montpellier, France

^b Department of International Health, University of Montpellier I, Montpellier, France

^c Departments of Medicine and Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA

^d Project PRESICA (Prevention du Sida au Cameroun), Military Hospital, Yaounde, Cameroon

^e Institute of Primate Research, Nairobi, Kenya

^f Division of Research Resources, Yerkes Regional Primate Research Center, Atlanta, GA 30329, USA

^g Howard Hughes Medical Institute, Birmingham, AL 35294, USA

Received 8 July 2005; returned to author for revision 31 August 2005; accepted 12 September 2005

Available online 27 October 2005

Abstract

Although it is now well established that a substantial proportion of wild-living primates in sub-Saharan Africa harbor SIV, no study to date has examined to what extent the various species are naturally infected. In this study, we first describe the development and validation of sensitive and specific SIV antibody detection assays representing all major known primate lentiviral lineages on a panel of 207 sera from 11 different primate species with known infection status. The newly developed assays were then used to determine SIV prevalence rates in nine primate species native to Cameroon. Analysis of 722 sera revealed widely varying prevalence rates, ranging from an apparent absence of SIV infection in crested mona (0/70), grey cheeked (0/36) and agile mangabeys (0/92), to prevalence rates of 3%, 4%, 11%, 27%, 39% and 52% for mustached (6/203), greater spot-nosed (8/193), northern talapoin (3/26), mantled guereza (14/52), De Brazza's (9/23) and mandrill (14/27) monkeys, respectively. The epidemiology of naturally occurring SIV infections is thus more complex than previously appreciated and the various non-human primate hosts seem to differ in their susceptibility to SIV infection. The newly developed assays should now permit to define with greater accuracy existing SIV reservoirs and associated human zoonotic risk.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: HIV; SIV; Prevalence; Non-human primates; Cameroon

Introduction

Simian immunodeficiency viruses (SIVs) comprise a diverse group of lentiviruses that infect a wide variety of non-human primate species in sub-Saharan Africa (Bailes et al., 2002; Peeters and Cournaud, 2002). Although seemingly not pathogenic for their natural hosts, these viruses have gained

public health attention since two of them have given rise to the human AIDS viruses, human immunodeficiency virus types 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2). It is now well established that HIV-1 resulted from cross-species transmissions of SIVcpz naturally infecting chimpanzees (*Pan troglodytes troglodytes*) in west central Africa; similarly, HIV-2 resulted from multiple transmissions of SIVsmm infecting sooty mangabeys (*Cercocebus atys*) in west Africa (Corbet et al., 2000; Damond et al., 2001; Gao et al., 1992; Hahn et al., 2000; Yamaguchi et al., 2000). To date, serological evidence of SIV infection has been reported in 36 different primate species and partial or full-length viral sequences have been recovered from 29 of these (Bibollet-

* Corresponding author. UMR 145-Laboratoire Retrovirus, IRD, 911 Ave. Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France. Fax: +33 4 67 41 61 46.

E-mail address: martine.peeters@mpl.ird.fr (M. Peeters).

Ruche et al., 2004). Phylogenetic analysis of these sequences has revealed an extraordinary degree of genetic diversity, with different SIVs varying by as much as 60% of their protein sequences (Bibollet-Ruche et al., 2004); however, SIV diversity is generally species specific, that is SIVs cluster as monophyletic lineages according to their species of origin, which has been used to classify them by adding a three-letter code reflecting their common species name.

Although both SIVcpz and SIVsmm are known to have crossed the species barrier to humans on multiple occasions (Corbet et al., 2000; Damond et al., 2001; Gao et al., 1992, 1999; Yamaguchi et al., 2000), the transmission potential of the other primate lentiviruses remains unknown. In a recent survey of bushmeat markets in Cameroon, we found evidence suggesting that a substantial proportion of wild-living monkeys are SIV infected (Peeters et al., 2002). Among 788 monkeys, representing 16 different species, a considerable fraction (17%) was found to harbor antibodies that cross-reacted with HIV-1 and HIV-2 antigens in a confirmatory (recombinant protein and synthetic peptide based) immunoassay (INNO-LIA, Innogenetics, Ghent, Belgium). PCR analysis of a subset of these cross-reactive samples led to the discovery of new SIV strains not previously known to infect primates. This bushmeat market survey thus documented for the first time that humans who hunt and butcher primates are routinely exposed to a plethora of genetically divergent SIV strains. However, the exact prevalence of SIV infection in the 16 species under study could not be determined because of the unknown extent of antigenic cross-reactivity of the HIV-based test.

Given the extraordinary degree of primate lentivirus diversity, no assay based on a single HIV or SIV strain is likely to be sufficiently cross-reactive to reliably detect antibodies directed against all other strains. To develop SIV-specific antibody detection tests, several groups have examined linear or multiple antigenic peptides (MAPs) encompassing the V3-loop region and/or the immunodominant gp41 ectodomain of the SIV envelope glycoprotein as antibody capture antigens (Masciotra et al., 2000; Ndongmo et al., 2004; Simon et al., 2001). While these approaches have been useful in detecting strain-specific antibodies in selected primate and human reference sera, not all known SIV strains have thus far been targeted for peptide design and their utility for diagnosing SIV infection in wild primate populations representing different species remains to be tested (Ndongmo et al., 2004; Masciotra et al., 2000; Simon et al., 2001). Finally, confirmatory immunoblot assays for SIVs other than SIVcpz/HIV-1 and SIVsmm/HIV-2 have not been developed. Thus, sensitive and specific diagnostic tools suitable for systematic and comprehensive surveys of SIV infection in wild primate populations still need to be developed.

To begin to characterize the epidemiology of natural SIV infections, we expressed the gp41 ectodomain of 11 different SIV strains and used these recombinant proteins, along with corresponding V3 loop peptides, as ELISA antigens to screen 722 primate sera for antibodies directed against SIVs from the same (homologous) and other (heterologous) species. The

results revealed a surprising array of seroprevalences, ranging from the apparent absence of SIV in some species to high level (50%) infection in others. Moreover, the overall number of SIV rgp41 ELISA-positive sera was considerably lower than that of INNO-LIA-positive sera, suggesting that for a subset of species, INNO-LIA had overestimated existing infection rates. These data thus indicate that not all naturally occurring SIV infections are common and wide spread, and that strain-specific screening and confirmatory assays will be required to determine the true extent of SIV infection in wild-living primate populations.

Results

Strain-specific ELISA-based assays for SIV antibody detection

To develop a comprehensive panel of SIV-specific serological assays, we selected antigens from 13 different strains which together represent all major known primate lentiviral lineages (Bibollet-Ruche et al., 2004). For 11 of these, we expressed the ectodomain of the transmembrane envelope glycoprotein (Figs. 1A and B) which is known to be highly immunogenic and has previously been used for SIV and HIV antibody detection (Allain et al., 1987; Georges-Courbot et al., 1998; Masciotra et al., 2000; Mauciere et al., 1997; Ndongmo et al., 2004; Saah et al., 1987; Simon et al., 2001). Recombinant proteins were generated as poly-histidine tagged fusion proteins and purified by metal ion affinity chromatography (Fig. 2). We also synthesized V3 loop peptides for 10 SIV strains, including SIVlho and SIVagm for which rgp41 proteins were not available (Fig. 1C; Table 1). Both rgp41 proteins and V3 loop peptides were evaluated as ELISA antigens using a panel of well-characterized reference sera from primates of known (PCR confirmed) infection status (Table 2).

To determine the cutoff values for the various peptide and rgp41 ELISAs, we examined the reactivity of sera from 144 uninfected monkeys (antibody and PCR negative) from 11 different species. For each test, the mean optical density (OD) plus five standard deviations was selected as the cut-off value, an approach deliberately intended to be conservative (Crowther, 2001). Fig. 3 depicts the results of these studies, with cut-off values indicated by red dots (vertical boxes with error bars represent the 25th and 75th percentiles of the negative serum reactivities for each antigen). The results revealed an overall lower background with peptide compared to rgp41 antigens.

The reactivity of the negative serum panel was then used to determine assay specificities. As shown in Tables 3a and 3b, none of the negative sera tested positive in the corresponding (homologous) rgp41 ELISA, and this was also true for the homologous peptide ELISAs except for one sooty mangabey serum that reacted weakly with the cognate SIVsmm V3 loop peptide. Thus, the overall specificity of homologous antibody detection was 100% for the rgp41 ELISAs, and 99% for the peptide ELISAs (Tables 3a and 3b). However, 3 of 144 negative sera reacted with low OD/cut-off ratios with

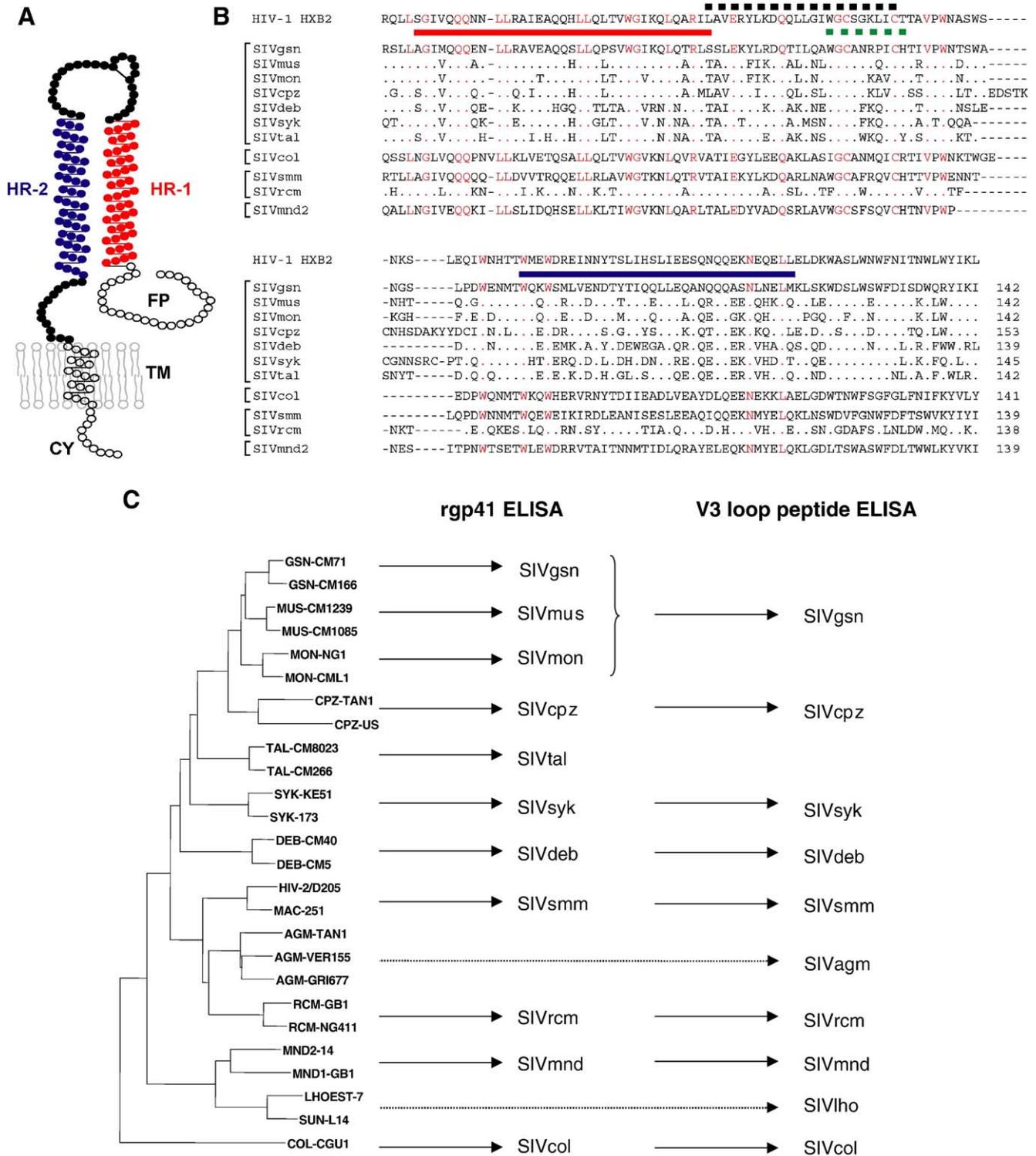


Fig. 1. (A) Schematic representation of the HIV/SIV transmembrane envelope glycoprotein (adapted from Desmeziers et al. (2005)). Amino acid residues included in the respective bacterially expressed gp41 fragments are shown as closed circles, with heptad repeat HR-1 and HR-2 domains highlighted in red and blue, respectively. Open circles represent rgp41 amino acid residues not present in the recombinant protein, including the fusion peptide (FP), the transmembrane domain (TM) and the intra-cytoplasmic region (CY). (B) Alignment of recombinant SIVrgp41 ectodomain sequences. The HIV-1 HXB2 amino acid sequence is shown as a reference, with the heptad repeat HR-1 and HR-2 domains underlined in red and blue, respectively. Amino acid residues conserved among all proteins are shown in red. SIV gp41 proteins are subdivided into four different groups (indicated by brackets) according to the phylogenetic relationships of their full-length Env protein sequences as shown in panel C (Bibollet-Ruche et al., 2004). Within groups, dots denote amino acid identity with the top sequence, while dashes were introduced to optimize the alignment. The length of the SIVrgp41 protein fragment is indicated for each strain. Black and green dotted lines indicate the position of peptides used in previously reported ELISA assays as described in Ndongmo et al. (2004); Simon et al. (2001), respectively. (C) Phylogenetic relationship of primate lentiviruses based on Env protein sequences (as determined by the neighbor joining algorithm) (Saitou and Nei, 1987). SIV strains used to design recombinant gp41 proteins and/or V3 loop peptides are indicated.

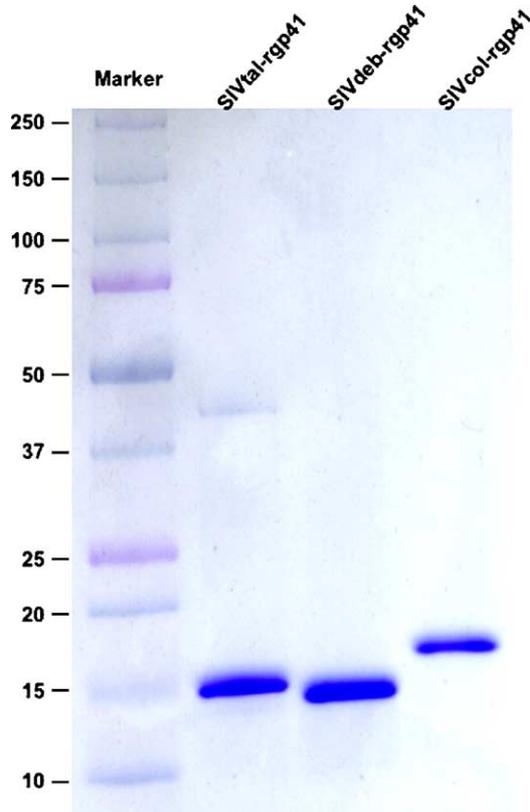


Fig. 2. Expression and purification of recombinant SIV gp41 proteins. The various SIV gp41 ectodomains were expressed as poly-histidine tagged fusion protein and purified by metal ion affinity chromatography. Purified aliquots of SIVtal-rgp41 (lane 2), SIVdeb-rgp41 (lane 3) and SIVcol-rgp41 (lane 4) were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis, using a 4–20% linear gradient ready gel (BioRad) and stained using Coomassie brilliant blue G250. Protein markers of known molecular weight are shown in lane 1 (precision plus protein dual color standards, BioRad). Protein purity was estimated by using the ChemiDoctm XRS Image System (BioRad, Hercules, CA). All expressed purified recombinant SIVrgp41 proteins were greater than 85% pure.

heterologous rgp41 proteins, and six others reacted weakly with heterologous peptides (Tables 3a and 3b; 4a and 4b). Although such reactivities could be indicative of cross-species infection, all sera reacted only weakly (OD/cut-off ratios less than 1.65) and in each case only with a single heterologous antigen. Moreover, the same sera tested negative in the corresponding V3 loop or rgp41 ELISAs, strongly suggesting

unspecific reactivities. Thus, the overall specificity of homologous and heterologous antibody detection was 98% for the rgp41 ELISAs, and 95% for the peptide ELISAs.

To determine the sensitivity of the various rgp41 and peptide ELISAs, a panel of positive reference sera from primates with PCR documented SIV infection was analyzed. As shown in Tables 3a and 3b, 62 of the 63 sera reacted strongly with the species-specific SIV gp41 proteins, indicating an overall sensitivity of 98%. The single false negative serum was from a known infected talapoin monkey. Although non-reactive in the homologous SIVtal rgp41 ELISA, this same sample scored positive in three other heterologous rgp41 ELISAs (SIVdeb, SIVsmm and SIVsyk) (Table 4a). Thus, taking both homologous and heterologous rgp41 reactivities into account, all antibody-positive sera were correctly identified. This was not the case for the synthetic peptide ELISAs (Table 3b). Overall, only 50 of 61 positive sera scored positive in the homologous peptide assays (82%), and this sensitivity did not improve when heterologous peptide reactivities were considered (Table 4b). Thus, while exhibiting similar specificities, the various peptide ELISAs were less sensitive at detecting homologous and heterologous antibodies than their rgp41 protein counterparts.

Extent of antigenic cross-reactivity between different SIV strains

To estimate how many strain-specific antibody detection tests would ultimately be required for comprehensive field testing, we examined the extent of antigenic cross-reactivity between the various (rgp41 and peptide) ELISAs and sera from different SIV-infected primate species. These data are summarized in Tables 4a and 4b, and in Fig. 4. Overall, the rgp41 ELISAs were considerably more cross-reactive than their peptide counterparts. For example, the SIVmon rgp41 ELISA detected all SIVmus, SIVgsn, SIVcpz, SIVmnd-2 and SIVsyk infections, and the SIVsmm rgp41 ELISA identified all SIVdeb, SIVtal and SIVsyk infections (Table 4a). By contrast, only SIVgsn and SIVcpz peptide ELISAs detected heterologous antibodies in an appreciable number of species, although most of these harbored closely related viruses (Table 4b; Fig. 1C); all other peptide ELISAs detected no, or only a negligible fraction of heterologous antibodies (Table 4b). Consistent with previous observations, these results indicate

Table 1
V3 peptide sequences representing different SIV lineages used in the ELISAs

SIV	SIV lineage	V3-sequence
SIVcpz-ant	HIV-1/SIVcpz	NRTVRNLQIGPGMTFYNVEIEATGDTRKAFK
SIVgsn-166	SIVgsn/mon/mus	GNKTIRNLQIGAGMTFYFSQVIVGGNTRKAYC
SIVagm-consensus	SIVagm	GNKTVLPVTIMAGLVFHSQKYNTLLRQAWC
SIVsmm-consensus	HIV-2/SIVsmm	GNKTVVPITLMSGLVFHSQPINKRPRQAWC
SIVsyk	SIVsyk	GNESIKNIQLAAGYFLPVIQGGKLTGRDAKRAFC
SIVrcm	SIVrcm	SNRTVKGISLATGVFISLRVEKRPKGAWC
SIVmnd-1	SIVmnd	GNRSVSTPSATGLLFYHGLEPGKNLKKGMK
SIVlho	SIVlho/sun	GNRSEVSTISSTGLLFYFGLEHGSRLRLAQC
SIVcol	SIVcol	GNSSHRNLNTANGAKFYELIPYSKGIYGRK
SIVdeb	SIVdeb	GNKTYRAVHMATGLSFYTFIPRLRIKRAHC

Table 2
Serum reference panel from SIV-infected and non-infected non human primate species

Species	Common name	SIV	SIV pos (n)	SIV neg (n)
<i>Cercopithecus neglectus</i>	De Brazza monkey	SIVdeb	6	3
<i>Cercopithecus cephus</i>	Mustached monkey	SIVmus	4	31
<i>Cercopithecus nictitans</i>	Greater spot nosed monkey	SIVgsn	6	47
<i>Cercopithecus mona</i>	Mona monkey	SIVmon	1	1
<i>Cercopithecus albogularis</i>	Sykes monkey	SIVsyk	14	35
<i>Colobus guereza</i>	Mantled guereza	SIVcol	9	9
<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandrill	SIVmnd-2	7	4
<i>Miopithecus ogouensis</i>	Northern talapoin	SIVtal	2	6
<i>Cercocebus atys</i>	Sooty mangabey	SIVsmm	9	7
<i>Cercocebus torquatus</i>	Red capped mangabey	SIVrcm	2	0
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzee	SIVcpz	3	1
Total			63	144

that antibodies directed against the V3 loop are more strain specific and thus more suitable to distinguish between different SIV infections than antibodies directed against the gp41 ectodomain (Masciotra et al., 2000; Ndongmo et al., 2004; Simon et al., 2001). Overall, the SIVdeb, SIVsmm, SIVmon and SIVtal rgp41 ELISAs were the most cross-reactive, detecting 80%, 74%, 72%, and 70% of all heterologous SIV infections, respectively. By contrast, SIV-

mus and SIVcpz rgp41 ELISAs were the least cross-reactive, identifying only about 30% of heterologous SIV infections. On a species level, sera from infected Sykes's monkeys reacted with the most, while sera from infected guereza colobus reacted with the least number of heterologous rgp41 proteins. Indeed, three sera from SIVcol-infected colobus monkeys reacted only with the homologous rgp41 ELISA. ELISA OD values were higher for homologous than heterologous reactivities (Fig. 4).

Although most rgp41 ELISAs were highly cross-reactive, the extent and direction of this cross-reactivity was variable. For example, the SIVdeb rgp41 ELISA identified all positive mandrill, Sykes's, talapoin, sooty mangabey and mustached monkey sera, but the reverse was only true for the SIVsmm rgp41 ELISA. SIVmnd2, SIVsyk, SIVtal and SIVmus rgp41 ELISAs identified only 2/6, 5/6, 4/6 and 0/6 of all positive De Brazza's monkey sera, respectively. Similarly, the SIVcol rgp41 ELISA detected all positive mustached and mona monkey sera, but only 2 of 6 positive greater spot nosed monkey sera; the remaining 4 went undetected despite the fact that greater spot nosed, mustached and mona monkeys all harbor genetically very closely related viruses (Fig. 1C). Finally, the SIVtal rgp41 ELISA identified only one positive talapoin serum, but detected 43 of 61 antibody-positive sera (70%) from other species. Thus, while strain-specific antibodies frequently cross-react with gp41 proteins from SIVs infecting other species, the magnitude and direction of this cross-reactivity is unpredictable and does not always correlate with the phylogenetic relatedness of the respective SIV strains.

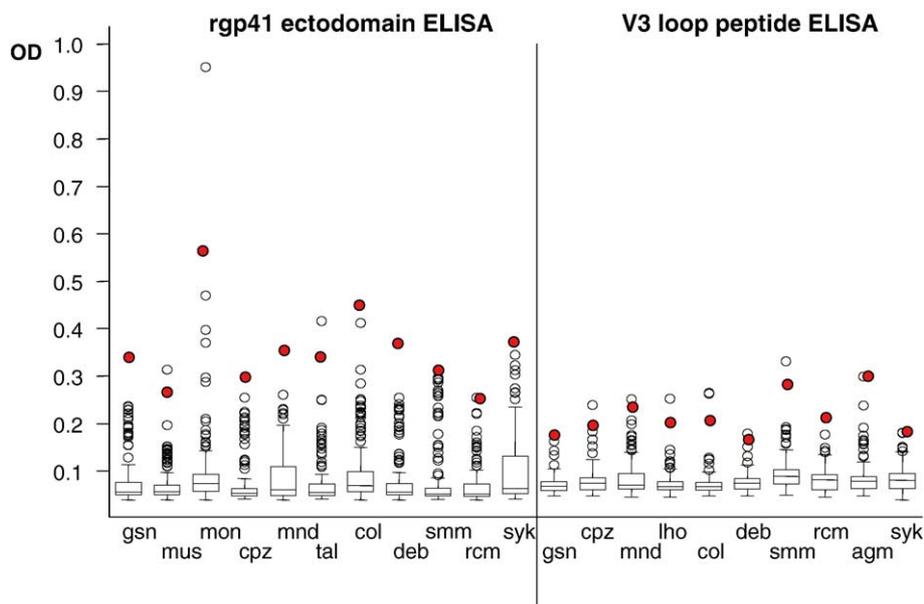


Fig. 3. Evaluation of recombinant protein (left panel) and synthetic peptide (right panel) based ELISAs (crude OD values) using sera from uninfected non-human primates ($n=144$). Vertical boxes with error bars represent the 25th [x_{25}] to 75th [x_{75}] percentiles (the so-called interquartile range, IQR) of seroreactivity ODs for each recombinant gp41 protein and peptide. The middle of the box represents the median or 50th percentile of the data, and the lines emerging from the box extend to the lower and upper adjacent values. The lower adjacent value is defined as the smallest data point greater than or equal to $x_{25} - 1.5 \times \text{IQR}$ and the upper adjacent value is defined as the largest data point less than or equal to $x_{75} + 1.5 \times \text{IQR}$. Observed points more extreme than the adjacent values are individually represented by open circles (Stata 7.0 software, Stata Corporation, College Station, Texas, USA). Red dots denote cut-off values calculated as the mean OD for each antigen plus 5 standard deviations (Crowther, 2001).

Table 3a
Sensitivity and specificity of the rgp41 SIV ELISA assays

Species	SIV	Homologous antibody detection				Homologous and heterologous antibody detection			
		$N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Sensitivity	$N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Specificity	$N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Sensitivity	$N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Specificity
<i>C. neglectus</i>	SIVdeb	6/6	100.0%	0/3	100.0%	52/63	82.5%	0/144	100.0%
<i>C. cephus</i>	SIVmus	4/4	100.0%	0/31	100.0%	23/63	36.5%	1/144	99.3%
<i>C. nictitans</i>	SIVgsn	6/6	100.0%	0/47	100.0%	35/63	55.6%	0/144	100.0%
<i>C. mona</i>	SIVmon	1/1	100.0%	0/1	100.0%	46/63	73.0%	1/144	99.3%
<i>C. albogularis</i>	SIVsyk	14/14	100.0%	0/35	100.0%	41/63	65.1%	0/144	100.0%
<i>C. guereza</i>	SIVcol	9/9	100.0%	0/9	100.0%	37/63	58.7%	0/144	100.0%
<i>M. sphinx</i>	SIVmnd-2	7/7	100.0%	0/4	100.0%	33/63	52.4%	0/144	100.0%
<i>M. ogouensis</i>	SIVtal	1/2	50.0%	0/6	100.0%	44/63	69.8%	1/144	99.3%
<i>C. atys</i>	SIVsmm	9/9	100.0%	0/7	100.0%	49/63	77.8%	0/144	100.0%
<i>C. torquatus</i>	SIVrcm	2/2	100.0%	NT	–	28/63	44.4%	0/144	100.0%
<i>P. t. troglodytes</i>	SIVcpz	3/3	100.0%	0/1	100.0%	21/63	33.3%	0/144	100.0%
Total		62/63	98.4%	0/144	100.0%	63/63	100.0%	3/144	97.9%
			(91.5–100.0) ^a		(97.9–100.0) ^a		(95.4–100.0) ^a		(94.0–99.6) ^a

^a 95% confidence intervals.

Prevalence of SIV infection in different primate species

Following assay validation, the newly developed ELISAs were employed to determine the prevalence of SIV infection in nine primate species native to Cameroon. Blood was collected from 589 additional monkeys sampled at various geographic sites, including bushmeat markets in and around the capital city of Yaounde, logging concessions in southeastern Cameroon, and villages in southwestern Cameroon. Thus, samples were collected over a wide range of locations representing different home ranges throughout southern Cameroon. All sera were subjected to homologous and heterologous rgp41 ELISA testing, while V3 peptide ELISAs were conducted in only selected cases. All sera were also screened by INNO-LIA to compare SIV strain specific with HIV cross-reactive antibody responses. Together with negative and positive reference sera from wild populations in Cameroon, INNO-LIA and rgp41 ELISA results were generated for a total of 722 primates.

Table 5 summarizes the proportion of SIV rgp41 ELISA-positive sera for members of six primate species for which an infecting SIV strain has been molecularly characterized (Bibollet-Ruche et al., 2004; Courgnaud et al., 2001, 2002; Souquiere et al., 2001) (F. Liegeois and M. Peeters, unpublished data). The results indicate a surprising range of naturally occurring SIV prevalences. Mandrills exhibited the highest infection rate, with over half of all animals harboring SIVmnd2-specific antibodies. De Brazza's and guereza colobus monkeys revealed intermediate seroprevalences, with 39% and 27% harboring strain-specific antibodies, respectively. By contrast, many fewer SIV seropositive talapoin (11%), greater spot nosed (3%) and mustached monkeys (4%) were identified, despite large numbers of available sera for the latter two species. All sera were tested using the entire panel of rgp41 ELISAs, with homologous assay results confirmed by heterologous assay results. For example, two talapoin monkeys initially misidentified as negative by the homologous SIVtal rgp41 ELISA scored positive in three heterologous rgp41 ELISAs (see below).

Table 3b
Sensitivity and specificity of the V3-peptide SIV ELISA assays

Species	SIV	Homologous antibody detection ^a				Homologous and heterologous antibody detection ^b			
		$N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Sensitivity	$N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Specificity	$N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Sensitivity	$N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Specificity
<i>C. neglectus</i>	SIVdeb	2/6	33.3%	0/3	100.0%	23/63	3.2%	1/144	99.3%
<i>C. cephus</i>	SIVgsn	4/4	100.0%	0/31	100.0%				
<i>C. nictitans</i>	SIVgsn	5/6	83.3%	0/47	100.0%				
<i>C. mona</i>	SIVgsn	1/1	100.0%	0/1	100.0%				
<i>C. albogularis</i>	SIVsyk	14/14	100.0%	0/35	100.0%	16/63	25.4%	0/144	100.0%
<i>C. guereza</i>	SIVcol	8/9	88.9%	0/9	100.0%	8/63	12.7%	2/144	98.6%
<i>M. sphinx</i>	SIVmnd-2	7/7	100.0%	0/4	100.0%	8/63	12.7%	0/144	100.0%
<i>C. atys</i>	SIVsmm	6/9	66.7%	1/7	85.7%	6/63	9.5%	1/144	99.3%
<i>C. torquatus</i>	SIVrcm	1/2	50.0%	NT	–	3/63	4.8%	0/144	100.0%
<i>P. troglodytes</i>	SIVcpz	2/3	66.7%	0/1	100.0%	14/63	22.2%	1/144	99.3%
–	SIVlho ^c	NT	–	NT	–	1/63	1.6%	1/144	99.3%
–	SIVagm ^c	NT	–	NT	–	3/63	4.8%	0/144	100.0%
Total		50/61	82.0%	1/138	99.3%	51/63	81.0%	7/144	95.1%
			(70.0–90.6) ^d		(96.0–100.0) ^d		(69.1–89.8) ^d		(90.2–98.0) ^d

^a Samples from Northern talapoins (*M. ogouensis*) were excluded for the homologous detection due to absence of SIVtal peptide.

^b All 207 sera from the reference panel were tested with all peptides.

^c SIVlho and SIVagm were only validated for heterologous antibody detection due to absence of reference sera for the corresponding SIV infected primates.

^d 95% confidence intervals.

Table 4a
Crossreactivity of SIV lineage-specific rgp41 ELISAs with sera from different primate species

Species	Primate sera	N_{tested}	SIVgsn ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVmus ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVmon ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVcpz ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVmnd-2 ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVtal ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVcol ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVdeb ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVrcm ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVsmm ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}	SIVsyk ELISA $N_{\text{pos}}/$ N_{tested}
<i>C. neglectus</i>	SIVdeb antibody neg	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>C. neglectus</i>	SIVdeb antibody pos	6	1/6	0/6	3/6	0/6	2/6	4/6	2/6	6/6	0/6	6/6	5/6
<i>C. guereza</i>	SIVcol antibody neg	9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
<i>C. guereza</i>	SIVcol antibody pos	9	1/9	5/9	3/9	1/9	0/9	1/9	9/9	2/9	0/9	0/9	0/9
<i>M. ogouensis</i>	SIVtal antibody neg	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>M. ogouensis</i>	SIVtal antibody pos	2	1/2	1/2	1/2	1/2	0/2	1/2	0/2	2/2	1/2	2/2	2/2
<i>M. sphinx</i>	SIVmnd-2 antibody neg	4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>M. sphinx</i>	SIVmnd-2 antibody pos	7	6/7	2/7	6/6(1nt)^a	1/7	7/7	5/7	7/7	7/7	5/7	7/7	5/7
<i>C. nictitans</i>	SIVgsn antibody neg	47	0/47	1/47	1/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47
<i>C. nictitans</i>	SIVgsn antibody pos	6	6/6	5/6	6/6	4/6	1/6	3/6	2/6	4/6	0/6	3/6	4/6
<i>C. cephus</i>	SIVmus antibody neg	31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31	0/31
<i>C. cephus</i>	SIVmus antibody pos	4	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	2/4	4/4	4/4	1/4	4/4	1/4
<i>C. mona</i>	SIVmon antibody neg	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C. mona</i>	SIVmon antibody pos	1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
<i>P. troglodytes</i>	SIVcpz antibody neg	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>P. troglodytes</i>	SIVcpz antibody pos	3	3/3	2/3	3/3	3/3	0/3	2/3	0/3	2/3	0/3	1/3	0/3
<i>C. atys</i>	SIVsmm antibody neg	7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
<i>C. atys</i>	SIVsmm antibody pos	9	3/9	2/9	5/9	3/9	8/9	9/9	4/9	9/9	8/9	9/9	9/9
<i>C. torquatus</i>	SIVrcm antibody pos	2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	0/2	1/2	2/2	2/2	0/2
<i>C. albogularis</i>	SIVsyk antibody neg	35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35
<i>C. albogularis</i>	SIVsyk antibody pos	14	9/14	1/14	14/14	4/14	14/14	14/14	8/14	14/14	11/14	14/14	14/14

SIV-positive and -negative reference sera from different primate species (left panel) have been tested with the 11 different rgp41 ELISAs (right panel). Homologous Elisa's are highlighted by a frame.

^a nt, not tested.

Having shown that sera from multiple species harbor SIV-specific antibodies, we next examined which of the SIV ELISA-positive sera also reacted with HIV-1 and HIV-2 proteins in the INNO-LIA assay and which exhibited discordant results. This analysis identified widely varying results depending on the species analyzed. For De Brazza's monkeys, both the SIVdeb rgp41 ELISA and the INNO-LIA identified the same number of antibody-positive sera, indicating 100% concordance for the two tests. For mandrills, 14 of 27 sera were SIVmnd-2 rgp41 ELISA-positive, and 15 of 27 sera were INNO-LIA-positive. PCR analysis of the one discordant sample failed to detect SIVmnd-2 sequences, suggesting absence of infection. Thus, with the exception of one potentially unspecific INNO-LIA result, both tests yielded comparable results. However, this was not the case for guereza colobus monkeys. Only 8 of 14 SIVcol ELISA-positive sera were also INNO-LIA-positive. Two of the discordant sera were positive in the SIVcol V3 peptide ELISA, and two others were confirmed by PCR amplification of virus-specific sequences to be derived from SIVcol-infected monkeys (not shown). Thus, for guereza colobus, INNO-LIA reactivity clearly underestimated the true SIVcol infection rate. The opposite was observed for northern

talapoin: only 1 of 26 sera tested SIVtal rgp41 ELISA-positive, while 3 were INNO-LIA-positive. These same 3 sera were also positive in heterologous SIVdeb, SIVsmm and SIVsyk ELISAs, and all 3 were confirmed by PCR to be derived from SIVtal-infected talapoin monkeys (Peeters et al., 2002), (F. Liegeois and M. Peeters, unpublished data). Thus, for northern talapoin, the INNO-LIA was more reliable than the lineage-specific rgp41 ELISA for detecting SIVtal infections.

By far, the most striking differences were observed for greater spot nosed and mustached monkeys. For mustached monkeys, only 6 of 203 sera were SIVmus rgp41 ELISA-positive, compared to 77 sera that were INNO-LIA-positive. Similarly, for greater spot nosed monkeys, only 8 of 193 sera were SIVgsn rgp41 ELISA-positive, compared to 33 that were INNO-LIA-positive, although all ELISA-positive sera were also INNO-LIA-positive. Further analysis indicated that all SIVgsn and SIVmus ELISA-positive sera also reacted with heterologous SIV rgp41 proteins (Table 5) and that the great majority was PCR-positive. By contrast, none of the discordant INNO-LIA positives reacted with the rgp41 proteins from SIVs infecting other species and none of a subset that was tested was PCR positive.

Table 4b

Crossreactivity of SIV lineage-specific V3 peptide ELISA assays with sera from different primate species

Species	Primate sera	N_{tested}	SIVgsn	SIVcpz	SIVmnd	SIVlho	SIVcol	SIVdeb	SIVrcm	SIVsmm	SIVagm	SIVsyk
			ELISA									
			$N_{\text{pos}}/$ N_{tested}									
<i>C. neglectus</i>	SIVdeb antibody neg	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>C. neglectus</i>	SIVdeb antibody pos	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>C. guereza</i>	SIVcol antibody neg	9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
<i>C. guereza</i>	SIVcol antibody pos	9	0/9	2/9	0/9	1/9	8/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
<i>M. ogouensis</i>	SIVtal antibody neg	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>M. ogouensis</i>	SIVtal antibody pos	2	0/2	1/2								
<i>M. sphinx</i>	SIVmnd-2 antibody neg	4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>M. sphinx</i>	SIVmnd-2 antibody pos	7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	2/7	0/7	0/7	1/7
<i>C. nictitans</i>	SIVgsn antibody neg	47	0/47	1/47	0/47	0/47	1/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47
<i>C. nictitans</i>	SIVgsn antibody pos	6	5/6	5/6	1/6	0/6						
<i>C. cephus</i>	SIVmus antibody neg	31	0/31	0/31	0/31	1/31	0/31	1/31	0/31	0/31	0/31	0/31
<i>C. cephus</i>	SIVmus antibody pos	4	4/4	4/4	0/4							
<i>C. mona</i>	SIVmon antibody neg	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C. mona</i>	SIVmon antibody pos	1	1/1	1/1	0/1							
<i>P. troglodytes</i>	SIVcpz antibody neg	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>P. troglodytes</i>	SIVcpz antibody pos	3	2/3	2/3	0/3							
<i>C. atys</i>	SIVsmm antibody neg	7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7
<i>C. atys</i>	SIVsmm antibody pos	9	2/7	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	6/9	3/9	0/9
<i>C. torquatus</i>	SIVrcm antibody pos	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2
<i>C. albogularis</i>	SIVsyk antibody neg	35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35
<i>C. albogularis</i>	SIVsyk antibody pos	14	9/14	0/14	14/14							

SIV-positive and -negative reference sera from different primate species (left panel) have been tested with the 10 different V3- ELISAs (right panel). Homologous Elisa's are highlighted by a frame.

Confirmatory Western blot analysis

To examine whether INNO-LIA positive but SIV ELISA negative greater spot nosed and mustached monkeys lacked V3 loop and gp41 antibodies but harbored antibodies directed against other envelope and/or core protein epitopes, we developed a Western blot assay that utilized SIVgsn Env containing pseudovirions as immunoblot antigens. To generate these pseudovirions, we first modified the codon usage of the SIVgsn env sequence to resemble that of highly expressed human genes. Codon usage optimized genes are known to express large quantities of envelope glycoproteins, which are efficiently incorporated into virus particles when expressed in trans (Andre et al., 1998; Gao et al., 2003, 2005). The codon optimized SIVgsn env (gp160) gene was then cotransfected with an env-minus HIV-1 backbone vector (HIV-1ΔenvSG3) (Wei et al., 2003), which resulted in the production of SIVgsn Env containing pseudovirions. These were purified by centrifugation through a sucrose cushion, analyzed for p24 Gag content, and used as antigens on Western blot strips (100 ng of p24 per strip).

Fig. 5 depicts the Western blot profiles of three different groups of sera: (i) greater spot nosed and mustached monkey sera that were both SIV ELISA and INNO-LIA positive (left panel); (ii) greater spot nosed and mustached monkey sera that were INNO-LIA positive, but SIV ELISA negative (middle

panel); (iii) greater spot nosed monkey sera that were both SIV ELISA and INNO-LIA negative (right panel). This analysis identified SIV-specific antibodies only in sera that were also SIV rgp41 ELISA positive: three greater spot nosed and three mustached monkey sera reacted strongly with the exterior portion (gp120) as well as the uncleaved gp160 precursor of the SIVgsn envelope glycoprotein (codon usage optimized envelope glycoproteins are only incompletely processed due to saturation of cellular proteases; (Andre et al., 1998; Gao et al., 2003, 2005)). Four of these same sera also recognized the transmembrane envelope glycoprotein (gp41) and three cross-reacted with the HIV-1 p24 Gag core protein. By contrast, all other sera including five that exhibited strong INNO-LIA reactivities with HIV-1 gp120 (S1079), gp41 (S43, S1267) and p17 Gag proteins (S1287, S1285) (not shown), failed to react with SIVgsn and HIV-1 proteins in the immunoblot assay. Thus, the discordant INNO-LIA positives represented unspecific reactivities.

Survey of primate species suspected to harbor SIV

Finally, we used the newly developed rgp41 ELISA to screen sera from 92 agile mangabeys (*Cercocebus agilis*), 70 crested mona monkeys (*Cercopithecus pogonias*) and 36 gray-cheeked mangabeys (*Lophocebus albigena*) for cross-reactive

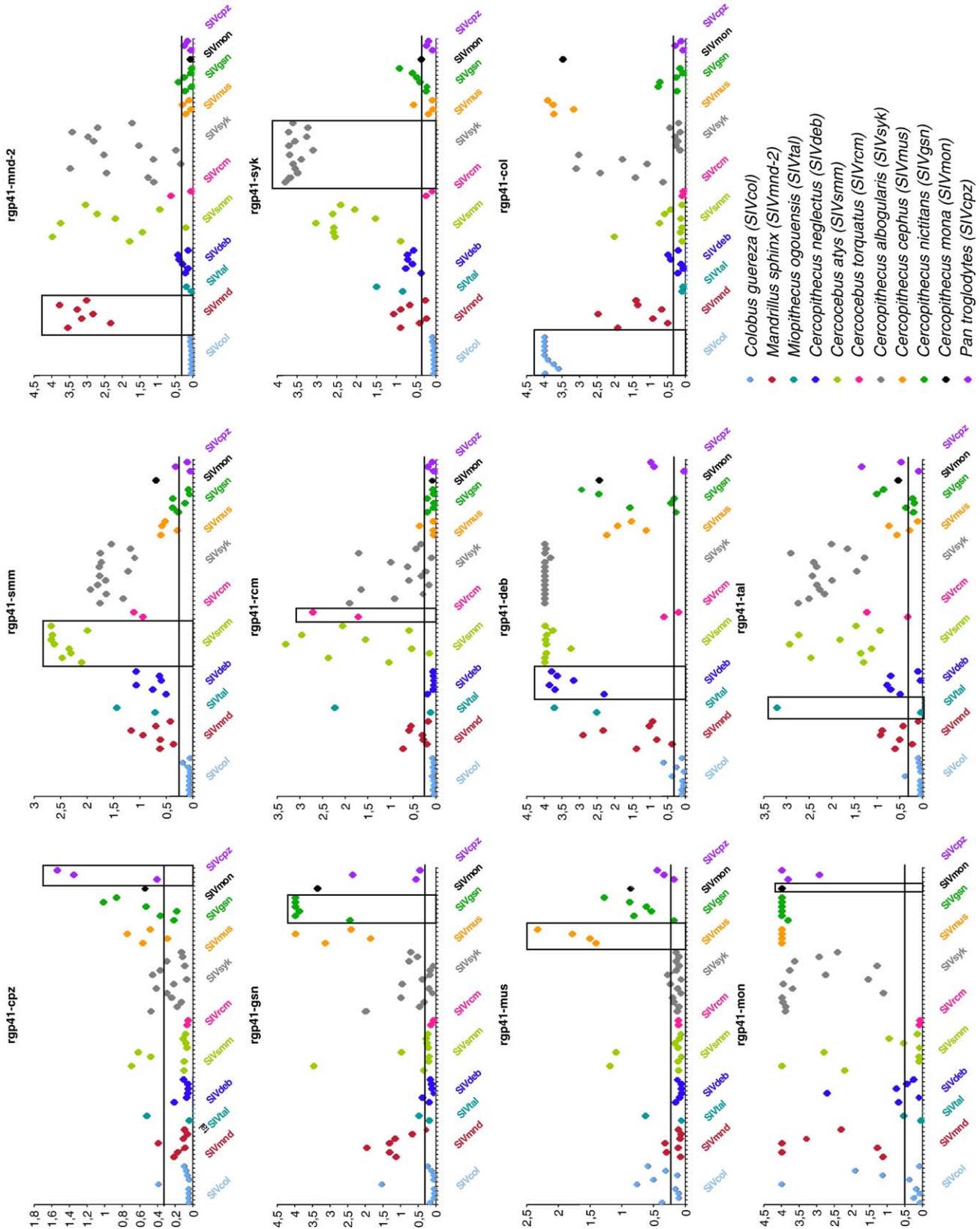


Fig. 4. ELISA cross-reactivity pattern of sera from primates with PCR confirmed SIV infection status. Crude OD values are shown on the x axis for eleven different rgp41 ELISA tests. Sera from different primate species are color-coded on the y axis. The cut-off for each test is indicated by a black horizontal line. For each ELISA, homologous antibody responses are shown in boxes.

Table 5
SIV prevalence rates in wild primate populations in Cameroon

Species	SIV strain	HIV-1/2 INNO-LIA	SIV rgp41 ELISA		SIV prevalence ^a (95% CI)
		$N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Homologous antibody detection $N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	Heterologous antibody detection $N_{\text{pos}}/N_{\text{tested}}$	
<i>Cercopithecus neglectus</i>	SIVdeb	9/23	9/23	9/23	39.1% (19.7–61.5)
<i>Mandrillus sphinx</i>	SIVmnd-2	15/27	14/27	13/27	51.8% (31.9–71.3)
<i>Colobus guereza</i>	SIVcol	8/52	14/52	8/52	26.9% (15.6–41.0)
<i>Miopithecus ogouensis</i>	SIVtal	3/26	1/26	3/26 ^b	11.5% (2.4–30.2)
<i>Cercopithecus cephus</i>	SIVmus	77/203	6/203	6/203	2.9% (1.1–6.3)
<i>Cercopithecus nictitans</i>	SIVgsn	33/193	8/193	8/193	4.1% (1.8–8.0)
<i>Cercopithecus pogonias</i>	– ^c	19/70	NT	(1)/70 ^d	0% ^e (0.0–4.2)
<i>Cercocebus agilis</i>	SIVagi ^f	27/92	NT	(1)/92 ^d	0% ^e (0.0–3.2)
<i>Lophocebus albigena</i>	– ^c	20/36	NT	0/36	0% (0.0–8.0)

^a SIV prevalence rates were calculated using the combined homologous and heterologous antibody reactivities as determined by the various SIV rgp41 ELISAs.

^b Two *M. ogouensis* samples were identified as antibody positive by heterologous SIV rgp41 ELISAs and both were confirmed to be derived from SIVtal infected animals by PCR and sequence analysis.

^c SIV infection has not yet been confirmed by amplification of SIV sequences.

^d The single observed reactivities were most likely unspecific (see text for details).

^e Confidence limits were calculated assuming zero positives among the sera tested.

^f SIVrcm like partial *pol* sequences have been amplified from 2 captive agile mangabeys (see text for details).

antibodies. Sera from these three species have previously been observed to react with HIV-1 and HIV-2 antigens, suggesting they might harbor as yet unidentified SIV strains (Peeters et al., 2002). Moreover, SIVrcm-like viruses were identified in two captive agile mangabeys by PCR amplification of subgenomic integrase sequences (E. Nerrienet, C. Apetrei, Y. Foupouapouognigni, B. Ling, A. Luckay, L. Chakrabarti, A. Ayouba, and P. Marx, Abstr. 14th Int. AIDS Conf., abstr. TuPeA4405, 2002). We thus examined whether our panel of strain-specific assays could uncover new SIV infections.

Consistent with previous results, we found 66 of the 198 sera to be INNO-LIA positive. However, using the entire set of rgp41 antigens, ELISA reactivity was only observed for two of the 198 sera. One from an agile mangabey scored positive in the SIVcol rgp41 ELISA, and the other from a crested mona reacted weakly in the SIVsyk rgp41 ELISA. In both instances, ELISA reactivities were limited to a single SIV rgp41 antigen, and all attempts to amplify SIV sequences from these two samples remained negative. Similarly, only 7 of the 198 sera scored weakly positive in the V3 peptide ELISAs. Again, none

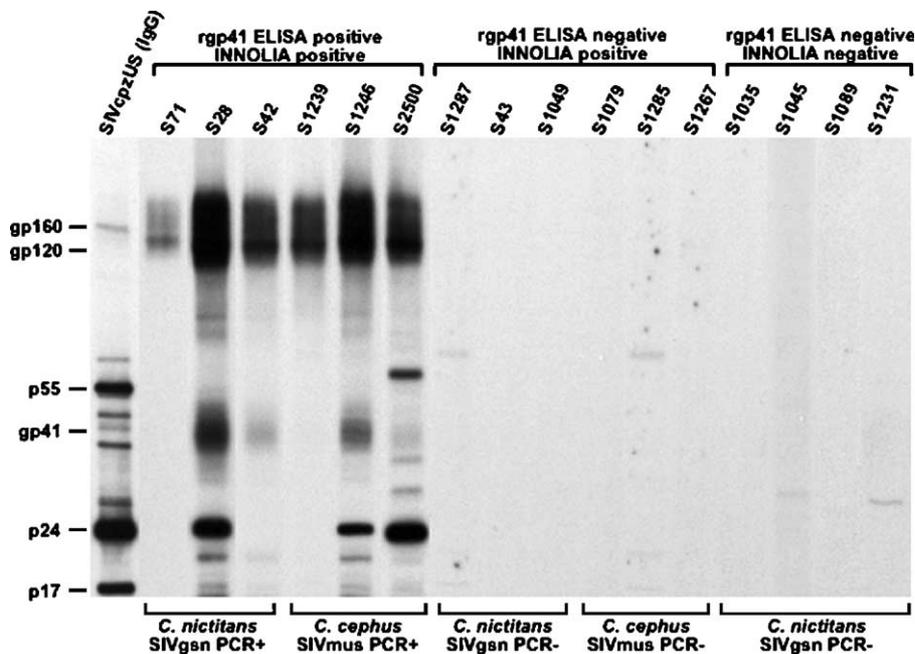


Fig. 5. SIVgsn-specific Western immunoblot. The Western blot reactivities of greater spot nosed (*C. nictitans*) and mustached (*C. cephus*) monkey sera (grouped by SIV PCR status as well as reactivity in SIVgsn and SIVmus rgp41 ELISA and INNO-LIA assays, respectively) with SIVgsn Env containing HIV-1 pseudovirions are shown. SIV-specific antibodies are detected only in sera that are both rgp41 ELISA and INNO-LIA positive. Pseudovirions were quantified by HIV-1 p24 antigen content; each strip contains 100 ng of p24 Gag protein. The positions of the SIVgsn gp160, gp120, and gp41 envelope glycoproteins, along with the HIV-1 backbone Gag proteins p55, p24, and p17, are shown on the left. Lane 1 depicts reactivities of a positive SIVcpz control (purified SIVcpzUS-specific IgG, 1 µg/ml).

of these was positive in the corresponding rgp41 ELISA and none was PCR positive. Finally, none of the 66 INNO-LIA-positive sera reacted with any of the SIV rgp41 ELISAs, and none contained amplifiable sequences. Taken together, the SIV-specific antibody detection assays failed to identify evidence of SIV infection in the crested mona, agile and grey-cheeked mangabey monkeys under study.

Discussion

Although it is now well established that a substantial proportion of wild-living primates in sub-Saharan Africa harbor SIV, no study to date has examined to what extent the various species are naturally infected, whether some species are the source of infection of others, and whether the viruses currently recognized represent the totality of SIV infection in nature. In this study, we describe the development and validation of a comprehensive panel of SIV-specific antibody detection tests and their use for SIV prevalence determinations in nine primate species. The results revealed an unexpectedly wide range of prevalence rates, with high levels of SIV infection in some species and rare or no infection in others. These data indicate that the epidemiology of naturally occurring SIV infections is more complex than previously appreciated and that the various non-human primate hosts differ in their susceptibility to SIV infection.

Assay development and screening strategies

Synthetic peptides have been used in the past to detect HIV- and SIV-specific antibodies in human and primate sera (Ayoub et al., 2000, 2001; Masciotra et al., 2000; Mauclore et al., 1997; Ndongmo et al., 2004; Simon et al., 2001). However, peptides cover only very short epitopes and are frequently not particularly sensitive as capture antigens unless their coating efficiency is increased by chemical modification. Moreover, antibodies directed against epitopes that differ in only few amino acids might not be detected. To generate a more robust set of antibody detection assays, we developed ELISA strategies that utilized both peptides and recombinant proteins as antibody capture antigens. For peptide design, we selected the V3 region of the SIV envelope because this domain is known to elicit antibodies that are suitable for distinguishing different SIV infections (Ndongmo et al., 2004; Simon et al., 2001). For the protein component, we expressed the entire ectodomain of the SIV transmembrane envelope domain because this region is highly immunogenic and comprises both linear and conformational epitopes due to partial refolding (Barin et al., 1985; Weissenhorn et al., 1997; Xu et al., 1991).

The sensitivity and specificity of the newly devised assays was determined using a comprehensive panel of well-characterized reference sera. These analyses showed that all but one of the rgp41 ELISAs detected homologous antibodies with 100% sensitivity and 100% specificity (Table 3a, 3b). Moreover, most of the rgp41 ELISAs were quite cross-reactive and thus provided corroborating evidence for homologous antibody results, although the extent and direction of cross-

reactivity varied based on the particular test and primate species analyzed. The V3 loop peptide ELISAs were less sensitive, but capable of discriminating between the different SIV lineages. This panel of rgp41 and V3 peptide-based ELISAs thus represents a comprehensive and versatile set of SIV antibody screening assays.

Although the combination of SIVmon, SIVsmm and SIVcol rgp41 ELISAs was sufficient to correctly identify all SIV infections in the control panel, the number of positive reference sera for each of the 11 primate species is still rather limited (Table 2). Thus, future serological surveys of primate population should employ the entire panel of rgp41 ELISAs, especially for species suspected but not yet confirmed to harbor SIV. Based on current data, we would expect true positives to react with both homologous and heterologous rgp41 proteins as well as with selected V3 loop peptides, especially if the latter are modified to increase their sensitivity (Masciotra et al., 2000; Ndongmo et al., 2004; Simon et al., 2001). As additional SIV infections are identified and confirmed, it should be possible to identify patterns of seroreactivity that are highly predictive of infection, even in the absence of PCR confirmation. In this context, it will be important to improve the sensitivity of the current SIVtal rgp41 ELISA by expressing and testing additional SIVtal rgp41 ectodomains and by examining the genetic and antigenic diversity of the gp41 region among different SIVtal strains. Finally, inclusion of recombinant SIVlho, SIVmnd-1 and SIVagm gp41 proteins would ensure representation of all currently known SIV lineages in the rgp41 ELISA screening panel.

HIV cross-reactivity as a predictor of SIV infection

All major SIV lineages known to date were initially discovered because their primate hosts had antibodies that cross-reacted with HIV-1 and/or HIV-2 antigens (Beer et al., 1999; Bibollet-Ruche et al., 1997, 2004; Courgnaud et al., 2001, 2003a, 2003b; Emau et al., 1991; Gao et al., 1999; Georges-Courbot et al., 1998; Ohta et al., 1988; Osterhaus et al., 1999; Peeters et al., 2002; Souquiere et al., 2001; Takehisa et al., 2001). Since commercially available HIV screening assays contain only a limited number of antigens, most SIV studies have used Western blot type tests to screen for cross-reactive antibodies. One of these, the INNO-LIA HIV Confirmation test, has proven particularly useful in identifying genetically divergent SIV strains. This test, which contains recombinant HIV-1 and HIV-2 proteins and synthetic peptides coated as discrete lines on a nylon strip, correctly identified 7 of the 13 currently known major SIV lineages (Bibollet-Ruche et al., 2004; Courgnaud et al., 2001, 2002, 2003a, 2003b; Peeters et al., 2002). Given this performance record, we examined to what extent the INNO-LIA was also useful in determining SIV prevalence rates in different primate species.

To determine the extent of INNO-LIA cross-reactivity, we compared the relative proportions of INNO-LIA and SIV ELISA-positive sera among the 722 primates analyzed. The results revealed marked differences, depending on which species was analyzed. For De Brazza's monkeys, mandrills,

talapoins, Sykes's monkeys, and sooty mangabeys, SIV ELISA and INNO-LIA tests performed at comparable levels, with very similar numbers of SIV-infected monkeys correctly identified (Table 5) (F. Bibollet-Ruche and B. H. Hahn, unpublished data). For guereza colobus, INNO-LIA failed to identify 40% of infected animals, but this was not unexpected given the extent of genetic divergence of SIVcol from other SIVs in the envelope region (Fig. 1C) and the low level of antigenic cross-reactivity generally observed for positive guereza colobus sera (Table 4a) (Ndongmo et al., 2004). However, the markedly discordant results for greater spot nosed and mustached monkey sera came as a surprise (Table 5). To exclude the possibility that infected members of these two species lacked antibodies to the particular ELISA antigens used, we tested a subset for reactivity with SIVgsn Env containing HIV-1 pseudovirions (Fig. 5). This analysis failed to detect SIV-specific antibodies in ELISA negative sera, while SIVgsn envelope as well as the HIV-1 p24 Gag-reactive antibodies were readily identified in ELISA-positive sera (Fig. 5). Moreover, none of the discordant INNO-LIA-positive sera were PCR positive or reacted with heterologous rgp41 antigens. Based on these data, we conclude that the bulk of the observed INNO-LIA reactivities for greater spot nosed and mustached monkeys are unspecific, and that the same appears to be true for crested mona, agile and grey-cheeked mangabeys (Table 5). It remains to be determined whether the unspecific reactivities are directed against HIV gene products or contaminating proteins in the INNO-LIA test. Regardless of the outcome, it is clear that the INNO-LIA has overestimated SIV prevalence rates in a number of different primate species, and that HIV antigen-based assays cannot be used to measure SIV prevalences in primate populations or identify SIV infections in humans.

Widely varying prevalence rates in naturally infected primate species

The great majority of primate species known to harbor a primate lentivirus exhibit high levels of SIV infection. The most extensively studied species, sooty mangabeys and African green monkeys, exhibit prevalence rates that frequently exceed 50% in adult animals, and this has been documented both in captivity and in the wild (Apetrei et al., 2005; Bibollet-Ruche et al., 1997; Jolly et al., 1996; Phillips-Conroy et al., 1994). High levels of SIV infection have also been identified in wild-living mandrills, De Brazza's and Sykes's monkeys, although relatively fewer animals have been characterized (Bibollet-Ruche et al., 2004; Ellis et al., 2004; Souquiere et al., 2001; Takehisa et al., 2001). Based on these results, it is now generally assumed that all natural SIV infections are common and widespread. Our finding of only 3% and 4% SIV infection rates in mustached and greater spot nosed monkeys, respectively, indicates that this assumption is not correct.

The reasons for varying SIV infection rates in different primate species are not known, but are likely due to a combination of viral, host and/or environmental factors. For example, SIVgsn and SIVmus could represent SIVs that were acquired relatively more recently and are thus not yet fully

adapted for efficient replication and spread in their new hosts. In this case, the low prevalence would be due to intrinsic viral properties. Alternatively, behavioral differences could somehow limit the extent of virus exposure of greater spot nosed and mustached monkeys relative to other species. However, it is known that SIVgsn and SIVmus are transmitted, albeit infrequently, among members of their respective primate species because their sequences form species-specific clusters in phylogenetic trees (Courgnaud et al., 2002, 2003a). In general, primates were sampled at many different sites throughout southern Cameroon and the few SIVgsn and SIVmus antibody positive samples that were identified, were derived from different geographic regions in Cameroon, excluding sampling bias as the reason for the different prevalence rates. Thus, while intrinsic viral properties or primate behavior may play a role, host genetic factors are likely the most important determinant of SIV transmission and persistence in wild primate populations. A number of intrinsic host defense mechanisms have recently been described (Bieniasz, 2004; Goff, 2004; Sheehy et al., 2002; Stremlau et al., 2004), and such restriction factors could greatly influence the relative susceptibility of primates to SIVs from their own as well as other species. Deciphering these host factors and their mechanisms of action will be important not only to understand the epidemiology and natural history of the various SIVs, but also to gauge their potential to cross-infect humans.

Finally, we used the newly developed antibody detection assays to screen members of three primate species, i.e., crested mona, agile and grey-cheeked mangabeys, which have been suspected but not yet confirmed to be naturally infected with SIV. Although a relative large number of sera scored INNO-LIA positive (see above), no evidence of infection was found using the SIV-specific assays. This result is particularly puzzling since two of 20 captive agile mangabeys have previously been reported to harbor SIVrcm-like viruses as determined by PCR amplification of a subgenomic (integrase) sequence (E. Nerrienet, C. Apetrei, Y. Foupouapouognigni, B. Ling, A. Luckay, L. Chakrabarti, A. Ayoub, and P. Marx, Abstr. 14th Int. AIDS Conf., abstr. TuPeA4405, 2002). Our ELISA panel included both recombinant SIVrcm gp41 protein and V3 peptides; yet, none of the 92 agile mangabey sera reacted with these antigens, suggesting the absence of SIVrcm Env-reactive antibodies. It is possible that SIVagi is a recombinant containing SIVrcm-like sequences in its 5' half and the sequences from a highly divergent SIV strain in its 3' half. Alternatively, the prevalence of SIVagi in agile mangabeys may be exceedingly low. Additional studies are required to address these possibilities and to determine whether crested mona, agile and grey-cheeked mangabeys harbor divergent SIV(s) that are not detected by the current strain-specific assays.

Testing humans for SIV infection

Given the magnitude of existing SIV reservoirs, studies are needed to determine whether transmission of simian lentiviruses other than SIVcpz and SIVsmm have occurred in regions where SIV infection of non-human primates is most prevalent. In this

paper, we report diagnostic assays that are capable of recognizing a wide range of naturally occurring SIV infections in primates. These same assays should be applicable to screening human risk groups that might constitute carriers of such infections, such as individuals who are frequently exposed to blood or bodily secretions of infected monkeys. In this context, it is important to note that we have explored both screening and confirmatory antibody detection strategies. Specifically, we show that a codon usage optimized SIV_{gsn} *env* gene can be used to generate pseudovirions which carry a significant amount of the SIV_{gsn} envelope glycoprotein on their surface (Fig. 5). Although the SIV_{gsn} Env containing pseudovirions did not mediate viral entry into CD4- and CCR5-positive human (JC53-BL) cells (not shown), they were readily produced and purified, and represented suitable Western blot immunogens (Fig. 5). Identical strategies can be used to generate SIV/HIV pseudovirions for all other naturally occurring SIV strains. In the absence of replication competent isolates which are unavailable for most SIV strains, this is the best strategy yet to document the presence of specific envelope (gp160, gp120 and gp41) antibodies in SIV rgp41 ELISA-reactive sera. Documentation of such antibodies in human sera would be highly suggestive of SIV infection even in the absence of PCR amplifiable viral sequences.

All SIV gp41 expression plasmids and the codon usage optimized SIV_{gsn} *env* gene have been submitted to the National Institute of Health Research and Reagent Program, Bethesda, MD and are thus available to investigators interested in the epidemiology and natural history of natural SIV infections.

Materials and methods

Expression and purification of recombinant gp41 (rgp41) proteins from different SIV strains

A gene segment spanning the ectodomain of the transmembrane (gp41) envelope domain (Fig. 1A) corresponding to amino acids 31–168 of the HIV-1/HXB2 gp41 protein (GenBank Accession number K03455) was amplified from molecular clones of SIVcpzTAN1 (AF447763), SIVsmmCI2 (unpublished), SIVrcmGAB1 (AF382829), SIVgsn99CM166 (AF468659), SIVmon99CMML1 (AY340701), SIVmus01CM1085 (AY340700), SIVmnd2-14CG (AF328295), SIVdebCM40 (AY523865), SIVtal00CM266 (unpublished), SIVsykKE51 (AY523867), and SIVcolCGU1 (AF301156) (Fig. 1B), and cloned into the bacterial expression vector pET-21d (Novagen, Madison, MI) in-frame with a C-terminal hexahistidine (6xHIS) tag. BL21-CodonPlus competent *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA) were transformed with the respective pET-SIVgp41 expression plasmids and grown overnight from a single clone. Aliquots of these cultures were then used to inoculate large-scale expression cultures. Expression of the 6xHIS-tagged SIV gp41 proteins was induced by adding isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) to the cultures (final concentration 1 mM) at an optical density (OD) of 0.6–0.8. After an additional incubation for 4 h at 37 °C, bacteria were harvested by low speed centrifugation at 4 °C, resuspended in 50 ml of phosphate-buffered

saline (PBS, pH 7.2), disrupted by sonication and treated with rLysozyme (Novagen, Madison, MI) for 20 min at room temperature to release inclusion bodies (IB). These were then concentrated by centrifugation, treated with Benzonase Nuclease (90 U/ml) for 4 h at room temperature to digest bacterial nucleic acids, washed three times with B-Per II bacterial protein extraction reagent (1:20) (Pierce, Rockford, IL), and solubilized in 50 ml of denaturing buffer (PBS containing 8M urea and 0.1% SDS). After pelleting debris, lysate supernatant was passed through a column containing Ni-NTA Superflow resin (Qiagen, Valencia, CA). The 6xHIS-tagged gp41 proteins were subsequently eluted from the column with PBS containing 0.5M imidazole, 0.1% SDS, 8M urea and dialyzed against PBS containing decreasing concentration of urea (4M, 2M and no urea) and SDS (0.05%, 0.025% and 0.01%). Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, CA), and the relative purity of 6xHIS-tagged rgp41 proteins was examined by SDS-PAGE electrophoresis, using 4–20% linear gradient ready gels (BioRad, Hercules, CA). Proteins were visualized by Coomassie brilliant blue G250 staining (Fig. 2) and their purity was estimated by using the ChemiDoc XRS Image System (BioRad, Hercules, CA). All expressed purified recombinant SIVrgp41 proteins were greater than 85% pure (Fig. 2).

Synthetic (V3 loop) peptides

Synthetic peptides corresponding to the V3 loop region of the extracellular envelope domain of ten different SIV strains or lineages were purchased from Neosystems (Strasbourg, France). Table 1 depicts the sequences of the different peptides and their corresponding SIV strains. Because the V3 amino acid sequences of SIV_{gsn}, SIV_{mus} and SIV_{mon} were virtually identical (Courgnaud et al., 2003a), only the SIV_{gsn} V3 loop peptide was synthesized. Similarly, the SIV_{mnd-2} V3 peptide was used as a representative of both SIV_{mnd-1} and SIV_{mnd-2} strains which are monophyletic in the envelope gene (Fig. 1C). Finally, consensus V3 loop sequences were synthesized for SIV_{agm} and SIV_{smm} lineages (Table 1).

Recombinant gp41 ELISA

ELISA plates (Corning, Corning, N.Y.) were coated (100 μ l/well) with recombinant gp41 (rgp41) protein (1 μ g/ml of total protein in PBS, pH 7.2) and incubated at 4 °C overnight. Plates were blocked using StabilCoat Immunoassay Stabilizer (SurModics, Eden Prairie, MN) (100 μ l/well) for 1 h at room temperature, dried at 37 °C for 2 h, and stored in a desiccator until use. To test primate sera for the presence of SIV-specific antibodies, plates were incubated with blocking buffer (PBS containing 0.5% Tween-20, 5% non-fat dry milk) for 1 h at 37 °C, and washed with PBST (PBS with 0.1% Tween-20). Serum or plasma samples were diluted 1:100 in blocking buffer, added to each well (100 μ l), incubated for 1 h at 37 °C, and washed with PBST. Goat-anti-human IgG-HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL) was diluted 1:20,000 in blocking buffer, added to each well (100 μ l), and incubated for 1 h at 37 °C.

After washing with PBST, 100 μ l of 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Solution (Sigma, St. Louis, MO) was added and incubated for 20 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 100 μ l of 1N sulfuric acid, and OD values were measured at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm in EX-800 ELISA reader (BIO-TEK Instruments, Inc., Winooski, VT).

Synthetic peptide ELISA

Polyvinylmicrotiter plates were coated with 0.25 μ g per well of each peptide in a 0.05M bicarbonate buffer, pH 9.6, by incubation at 37 °C for 20 h. After washing with phosphate-buffer saline (PBS) containing 0.5% Tween 20, unoccupied sites were blocked with PBS containing 5% fetal calf serum, for 2 h at 37 °C followed by washing with PBS-Tween. Sera were diluted 1:100 in a hypertonic PBS solution (0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.75M NaCl, 10% fetal calf serum, and 0.5% Tween 20). After incubation for 30 min at room temperature, plates were washed and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG for 30 min at room temperature. After washing, the reaction was developed with hydrogen peroxide-*o*-phenyldiamine for 15 min at room temperature in the dark. Reactions were terminated by adding 2N H₂SO₄, and optical densities (OD) were read at 492 nm.

Data analysis

Cut-off values for each peptide and rgp41 ELISA were determined by calculating the mean optical densities (ODs) for all antibody negative reference sera plus 5 standard deviations (Crowther, 2001). A sample with an OD/cut-off ratio of equal and/or greater than 1 was scored positive, and a OD/cut-off value of less than 1 was scored negative. For each peptide and rgp41 antigen, the sensitivity and specificity of detecting antibodies to the homologous virus were calculated. Sensitivity was calculated as the number of ELISA-reactive samples divided by the total number of SIV antibody-positive samples, multiplied by 100. Specificity was calculated as the number of ELISA negative samples, divided by the total number of SIV antibody negative samples, multiplied by 100. Confidence limits were determined given the assumption of binomial sampling (Stata 7.0 software, Stata Corporation, College Station, TX, USA).

Reference sera from primates of known infection status

A panel of well-characterized reference sera was selected from 207 primates in whom SIV infection was either confirmed or excluded by PCR amplification of viral sequences from peripheral blood mononuclear cell DNA (Table 2). The majority of these sera were chosen from the previous bushmeat survey (Peeters et al., 2002) and included sera from (infected/uninfected) De Brazza's (5/3), mustached (4/31), greater spot nosed (6/47), mona (1/1), mandrill (7/4), mantled guereza (8/9) and northern talapoin (2/6) monkeys. Additional sera from two infected red capped mangabeys, one De Brazza's monkey and one guereza colobus were identified more recently. Reference

sera were also obtained from captive chimpanzees (3/1), captive sooty mangabeys (9/7) and wild-living Sykes's monkeys (14/35). The latter were collected from Lowland Sykes' monkeys (*C. a. kibonotensis*) in southern Kenya (close to Mombasa) and Highland Sykes's monkeys (*C. a. kolbi*) in central Kenya (in the vicinity of Nairobi), which were trapped by investigators of the Institute of Primate Research after obtaining approval by the Kenya Wildlife Service. Following blood drawing, all animals were released back into the wild. Blood samples were first screened for HIV-1/HIV-2 cross-reactive antibodies and subsequently subjected to PCR analysis using two sets of virus-specific primers targeting *pol* and *gp41* genes (F. Bibollet-Ruche and B. H. Hahn, unpublished data).

Sera from primate bushmeat and pet monkeys

For prevalence determinations, 589 additional primates were studied from geographically diverse sites throughout southern Cameroon, including bushmeat markets in and around the capital city of Yaounde, logging concessions in southeastern Cameroon and villages in southwestern Cameroon. 265 of these were selected from the previous bushmeat survey (Peeters et al., 2002), while an additional 324 were obtained more recently. The selection criterion for all sera was that they were available in sufficient quantities for multiple serological analyses. As described previously, blood was collected from primate bushmeat by cardiac puncture and from pet monkeys by venipuncture after tranquilizing the animals with ketamine (Peeters et al., 2002); all samples were obtained with approval from the Cameroonian Ministry of Environment and Forestry. Plasma and cells were separated on site by Ficoll gradient centrifugation. All samples were screened for HIV-1 and HIV-2 cross-reactive antibodies using the INNO-LIA HIV Confirmatory assay (Innogenetics, Gent, Belgium); however, PCR analysis was not performed to confirm their respective infection status.

Codon usage optimization of the SIVgsn env gene

The codon usage of the SIVgsn99CM166 *env* sequence (AF468659) was inspected and transcribed manually to that of highly expressed human genes as described (Andre et al., 1998; Gao et al., 2003). A Kozak sequence (GCCGCCGCC) was added immediately prior to the first methionine codon (ATG) and the modified sequence was subdivided into three non-overlapping fragments, each of which was bounded by unique restriction enzyme sites to facilitate cloning following gene synthesis (fragment A: 1–873nt, *Xba*I–*Bsp*HI; fragment B: 866–1834nt, *Bsp*HI–*Sbf*I; fragment C: 1827–2667nt, *Sbf*I–*Bam*HI). None of these sequence modifications resulted in changes of the SIVgsn encoded Env glycoprotein sequence. The three fragments were purchased from a commercial vendor (DNA 2.0, Menlo Park, CA), sequence confirmed upon receipt, concatenated and cloned into the eukaryotic expression vector pCMV/R (kindly provided by Dr. Gary Nabel). The codon usage optimized CMV/R-SIVgsn *env* gene sequence is available under GenBank accession number AY995800.

SIVgsn-specific Western immunoblot

293T cells were co-transfected in 100 mm dishes ($n=20$) with the codon usage optimized SIVgsn *env* gene (pCMV/R-SIVgsnEnv; 10 μ g) and an *env*-minus HIV-1 backbone vector (pSG3 Δ Env; 30 μ g) (Decker et al., 2005; Wei et al., 2003) to generate HIV-1 pseudovirions containing the SIVgsn envelope glycoprotein (Effectene Transfection Reagent, Qiagen, Valencia, CA). Forty-eight hours post transfection, culture supernatants were harvested, passed through 0.22 μ m filter (Millipore Express Plus Membrane filter; Millipore Corp., Bedford, MA), and ultracentrifuged twice through a 20% sucrose cushion (23,500 \times g; 2 h). Pseudovirion pellets were resuspended in 500 μ l PBS and quantified by determining their HIV-1 p24 antigen content (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Pseudovirions were lysed in Reducing Sample Buffer (Pierce, Rockford, IL) and run on a 4–15% linear gradient gel (BioRad, Hercules, CA). Following electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (BioRad, Hercules, CA), incubated with StabilCoat Immunoassay Stabilizer (SurModics, Eden Prairie, MN) for 1 h at room temperature, and dried. Individually cut membrane strips (4 mm width) were first incubated with blocking buffer (5% nonfat dry milk, 3% fetal bovine sera, 0.5% Tween-20 in PBS) for 1 h at room temperature, and then reacted over night at 4 $^{\circ}$ C with sera from greater spot-nosed and mustached monkeys (diluted 1:2,000 in PBS) which had been pre-incubated with 293T cell lysates (1 mg total protein per ml of serum dilution) at room temperature for 1 h to remove unspecific reactivities to cell derived antigens. Protein-bound antibody was probed with goat-anti-human IgG-HRP for 1 h at room temperature (1: 2,000; Southern Biotech, Birmingham, AL) and developed using an enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) on Hyperfilm-ECL.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the National Institute of Health (RO1 AI 058718, RO1 AI 50529, N01 AI 85338, P20 AI 27767), the Howard Hughes Medical Institute, and the Agence National de Recherche sur le SIDA (ANRS).

We thank Silvia and David McPherson (UAB Center for AIDS Research Molecular Biology Core) for technical expertise in preparing recombinant gp41 proteins; Maria Salazar for nucleotide sequence determinations (UAB Center for AIDS Research Sequencing Core); W.J. Abbott for artwork; the Cameroonian Ministries of Health, Research, Environment and Forestry and Wildlife, for permission to perform this study, and the staff from project PRESICA for logistical support and assistance in the field.

References

Allain, J.P., Laurian, Y., Paul, D.A., Verroust, F., Leuther, M., Gazengel, C., Senn, D., Larrieu, M.J., Bossier, C., 1987. Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p24 and gp41 in patients with hemophilia. Potential clinical importance. *N. Engl. J. Med.* 317, 1114–1121.

- Andre, S., Seed, B., Eberle, J., Schraut, W., Bultmann, A., Haas, J., 1998. Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J. Virol.* 72, 1497–1503.
- Apetrei, C., Metzger, M.J., Richardson, D., Ling, B., Telfer, P.T., Reed, P., Robertson, D.L., Marx, P.A., 2005. Detection and partial characterization of simian immunodeficiency virus SIVsm strains from bush meat samples from rural Sierra Leone. *J. Virol.* 79, 2631–2636.
- Ayoub, A., Souquieres, S., Njinku, B., Martin, P.M., Muller-Trutwin, M.C., Roques, P., Barre-Sinoussi, F., Mauclele, P., Simon, F., Nerrienet, E., 2000. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* 14, 2623–2625.
- Ayoub, A., Mauclele, P., Martin, P.M., Cunin, P., Mfoupouendoun, J., Njinku, B., Souquieres, S., Simon, F., 2001. HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 466–467.
- Bailes, E., Chaudhuri, R.R., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Hahn, B., Sharp, P.M., 2002. The evolution of primate lentiviruses and the origins of AIDS, p. 65–96. In: Leitner, T.A. (Ed.), *The Molecular Epidemiology of Human Viruses*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Barin, F., McLane, M.F., Allan, J.S., Lee, T.H., Groopman, J.E., Essex, M., 1985. Virus envelope protein of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science* 228, 1094–1096.
- Beer, B.E., Bailes, E., Goeken, R., Dapolito, G., Coulibaly, C., Norley, S.G., Kurth, R., Gautier, J.P., Gautier-Hion, A., Vallet, D., Sharp, P.M., Hirsch, V.M., 1999. Simian immunodeficiency virus (SIV) from sun-tailed monkeys (*Cercopithecus solatus*): evidence for host-dependent evolution of SIV within the *C. lhoesti* superspecies. *J. Virol.* 73, 7734–7744.
- Bibollet-Ruche, F., Brengues, C., Galat-Luong, A., Galat, G., Pourrut, X., Vidal, N., Veas, F., Durand, J.P., Cuny, G., 1997. Genetic diversity of simian immunodeficiency viruses from West African green monkeys: evidence of multiple genotypes within populations from the same geographical locale. *J. Virol.* 71, 307–313.
- Bibollet-Ruche, F., Bailes, E., Gao, F., Pourrut, X., Barlow, K.L., Clewley, J.P., Mwenda, J.M., Langat, D.K., Chege, G.K., McClure, H.M., Mpoudi-Ngole, E., Delaporte, E., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., Hahn, B.H., 2004. New simian immunodeficiency virus infecting De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*): evidence for a *Cercopithecus* monkey virus clade. *J. Virol.* 78, 7748–7762.
- Bieniasz, P.D., 2004. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat. Immunol.* 5, 1109–1115.
- Corbet, S., Muller-Trutwin, M.C., Versmissie, P., Delarue, S., Ayoub, A., Lewis, J., Brunak, S., Martin, P., Brun-Vezinet, F., Simon, F., Barre-Sinoussi, F., Mauclele, P., 2000. *env* sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J. Virol.* 74, 529–534.
- Cournaud, V., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Mpoudi-Ngole, E., Bourgeois, A., Delaporte, E., Peeters, M., 2001. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus from guereza colobus monkeys (*Colobus guereza*) in Cameroon: a new lineage in the nonhuman primate lentivirus family. *J. Virol.* 75, 857–866.
- Cournaud, V., Salemi, M., Pourrut, X., Mpoudi-Ngole, E., Abela, B., Auzel, P., Bibollet-Ruche, F., Hahn, B., Vandamme, A.M., Delaporte, E., Peeters, M., 2002. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a *vpu* gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *J. Virol.* 76, 8298–8309.
- Cournaud, V., Abela, B., Pourrut, X., Mpoudi-Ngole, E., Loul, S., Delaporte, E., Peeters, M., 2003a. Identification of a new simian immunodeficiency virus lineage with a *vpu* gene present among different *Cercopithecus* monkeys (*C. mona*, *C. cephus*, and *C. nictitans*) from Cameroon. *J. Virol.* 77, 12523–12534.
- Cournaud, V., Formenty, P., Akoua-Koffi, C., Noe, R., Boesch, C., Delaporte, E., Peeters, M., 2003b. Partial molecular characterization of simian immunodeficiency viruses (SIV) from African colobids, SIVwrc from Western red colobus (*Piliocolobus badius*) and SIVlc from Olive colobus (*Procolobus verus*). *J. Virol.* 77, 744–748.

- Crowther, J.R., 2001. The ELISA guidebook. In: Walker, J.M. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 149. Humana Press, Totowa, NJ.
- Damond, F., Apetrei, C., Robertson, D.L., Souquiere, S., Lepretre, A., Matheron, S., Plantier, J.C., Brun-Vezinet, F., Simon, F., 2001. Variability of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infecting patients living in France. *Virology* 280, 19–30.
- Decker, J.M., Bibollet-Ruche, F., Wei, X., Wang, S., Levy, D.N., Wang, W., Delaporte, E., Peeters, M., Derdeyn, C.A., Allen, S., Hunter, E., Saag, M.S., Hoxie, J.A., Hahn, H.B., Kwong, P.D., Robinson, E.J., Shaw, M.G., 2005. Antigenic conservation and immunogenicity of the HIV co-receptor binding site. *Exp. J. Med.* 201, 1407–1419.
- Desmezieres, E., Gupta, N., Vassell, R., He, Y., Peden, K., Sirota, L., Yang, Z., Wingfield, P., Weiss, C.D., 2005. Human immunodeficiency virus (HIV) gp41 escape mutants: cross-resistance to peptide inhibitors of HIV fusion and altered receptor activation of gp120. *J. Virol.* 79, 4774–4781.
- Ellis, B.R., Munene, E., Elliott, D., Robinson, J., Otsyula, M.G., Michael, S.F., 2004. Seroprevalence of simian immunodeficiency virus in wild and captive born Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) in Kenya. *Retrovirology* 1, 34.
- Emau, P., McClure, H.M., Isahakia, M., Else, J.G., Fultz, P.N., 1991. Isolation from African Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 65, 2135–2140.
- Gao, F., Yue, L., White, A.T., Pappas, P.G., Barchue, J., Hanson, A.P., Greene, B.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Hahn, B.H., 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358, 495–499.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., Hahn, B.H., 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee (*Pan troglodytes troglodytes*). *Nature* 397, 436–441.
- Gao, F., Li, Y., Decker, J.M., Peyerl, F.W., Bibollet-Ruche, F., Rodenburg, C.M., Chen, Y., Shaw, D.R., Allen, S., Musonda, R., Shaw, G.M., Zajac, A.J., Letvin, N., Hahn, B.H., 2003. Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: in vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19, 817–823.
- Gao, F., Weaver, E.A., Lu, Z., Li, Y., Liao, H.X., Ma, B., Alam, S.M., Scarce, R.M., Sutherland, L.L., Yu, J.S., Decker, J.M., Shaw, G.M., Montefiori, D.C., Korber, B.T., Hahn, B.H., Haynes, B.F., 2005. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group M consensus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 79, 1154–1163.
- Georges-Courbot, M.C., Lu, C.Y., Makuwa, M., Telfer, P., Onanga, R., Dubreuil, G., Chen, Z., Smith, S.M., Georges, A., Gao, F., Hahn, B.H., Marx, P.A., 1998. Natural infection of a household pet red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 72, 600–608.
- Goff, S.P., 2004. Retrovirus restriction factors. *Mol. Cell* 16, 849–859.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., Sharp, P.M., 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287, 607–614.
- Jolly, C., Phillips-Conroy, J.E., Turner, T.R., Broussard, S., Allan, J.S., 1996. SIVagm incidence over two decades in a natural population of Ethiopian grivet monkeys (*Cercopithecus aethiops aethiops*). *J. Med. Primatol.* 25, 78–83.
- Masciotra, S., Rudolph, D.L., van der Groen, G., Yang, C., Lal, R.B., 2000. Serological detection of infection with diverse human and simian immunodeficiency viruses using consensus env peptides. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 706–709.
- Mauclere, P., Damond, F., Apetrei, C., Loussert-Ajaka, I., Souquiere, S., Buzelay, L., Dalbon, P., Jolivet, M., Mony Lobe, M., Brun-Vezinet, F., Simon, F., Barin, F., 1997. Synthetic peptide ELISAs for detection of and discrimination between group M and group O HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 987–993.
- Ndongmo, C.B., Switzer, W.M., Pau, C.P., Zeh, C., Schaefer, A., Pieniazek, D., Folks, T.M., Kalish, M.L., 2004. New multiple antigenic peptide-based enzyme immunoassay for detection of simian immunodeficiency virus infection in nonhuman primates and humans. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5161–5169.
- Ohta, Y., Masuda, T., Tsujimoto, H., Ishikawa, K., Kodama, T., Morikawa, S., Nakai, M., Honjo, S., Hayami, M., 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.
- Osterhaus, A.D., Pedersen, N., van Amerongen, G., Frankenhuis, M.T., Marthas, M., Reay, E., Rose, T.M., Pamungkas, J., Bosch, M.L., 1999. Isolation and partial characterization of a lentivirus from talapoin monkeys (*Miopithecus talapoin*). *Virology* 260, 116–124.
- Peeters, M., Courgnaud, V., 2002. Overview of primate lentiviruses and the evolution of non-human primates in Africa. In: Kuiken, C., Foley, B., Freed, E., Hahn, B., Korber, B., Marx, P., McCutchan, F., Mellors, J.W., Wolinsky, S. (Eds.), *HIV Sequence Compendium. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM*, p. 2–23.
- Peeters, M., Courgnaud, V., Abela, B., Auzel, P., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Loul, S., Liegeois, F., Butel, C., Koulagna, D., Mpoudi-Ngole, E., Shaw, G.M., Hahn, B.H., Delaporte, E., 2002. Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerging Infect. Dis.* 8, 451–457.
- Phillips-Conroy, J.E., Jolly, C.J., Petros, B., Allan, J.S., Desrosiers, R.C., 1994. Sexual transmission of SIVagm in wild grivet monkeys. *J. Med. Primatol.* 23, 1–7.
- Saah, A.J., Farzadegan, H., Fox, R., Nishanian, P., Rinaldo Jr., C.R., Phair, J.P., Fahey, J.L., Lee, T.H., Polk, B.F., 1987. Detection of early antibodies in human immunodeficiency virus infection by enzyme-linked immunosorbent assay, Western blot, and radioimmunoprecipitation. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1605–1610.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., Malim, M.H., 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646–650.
- Simon, F., Souquiere, S., Damond, F., Kfutwah, A., Makuwa, M., Leroy, E., Rouquet, P., Berthier, L.J., Rigoulet, J., Lecu, A., Telfer, P.T., Pandrea, I., Plantier, J.C., Barre-Sinoussi, F., Roques, P., Muller-Trutwin, M.C., Apetrei, C., 2001. Synthetic peptide strategy for the detection of and discrimination among highly divergent primate lentiviruses. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 17, 937–952.
- Souquiere, S., Bibollet-Ruche, F., Robertson, D.L., Makuwa, M., Apetrei, C., Onanga, R., Kornfeld, C., Plantier, J.C., Gao, F., Abernethy, K., White, L.J., Karesh, W., Telfer, P., Wickings, E.J., Mauclere, P., Marx, P.A., Barre-Sinoussi, F., Hahn, B.H., Muller-Trutwin, M.C., Simon, F., 2001. Wild *Mandrillus sphinx* are carriers of two types of lentivirus. *J. Virol.* 75, 7086–7096.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., Sodroski, J., 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848–853.
- Takehisa, J., Harada, Y., Ndambi, N., Mboudjeka, I., Taniguchi, Y., Ngansop, C., Kuate, S., Zekeng, L., Ibuki, K., Shimada, T., Bikandou, B., Yamaguchi-Kabata, Y., Miura, T., Ikeda, M., Ichimura, H., Kaptue, L., Hayami, M., 2001. Natural infection of wild-born mandrills (*Mandrillus sphinx*) with two different types of simian immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1143–1154.
- Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., Komarova, N.L., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Kwong, P.D., Shaw, G.M., 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307–312.
- Weissenhorn, W., Calder, L.J., Dessen, A., Laue, T., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1997. Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 gp41 ectodomain expressed in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6065–6069.
- Xu, J.Y., Gorny, M.K., Palker, T., Karwowska, S., Zolla-Pazner, S., 1991. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J. Virol.* 65, 4832–4838.
- Yamaguchi, J., Devare, S.G., Brennan, C.A., 2000. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 925–930.

Chapitre II

Caractérisation de SIV chez les primates fréquemment chassés et consommés au Cameroun

A. CAS DES MOUSTACS (*Cercopithecus cephus*)

I. Introduction

Les primates africains sont naturellement porteurs du virus de l'immunodéficience simienne (SIV). A ce jour, les analyses sérologiques ont mis en évidence la présence d'un SIV chez 36 espèces de ces primates et dans 30 des cas l'infection a été confirmée par des analyses moléculaires (50). L'évolution des lentivirus de primate est extrêmement complexe, mais est généralement spécifique à l'espèce, c'est-à-dire que les SIV identifiés dans une même espèce forment en général un groupe monophylétique. Dans ce contexte, des lignées phylogénétiques ont été définies pour regrouper les virus plus proches les uns des autres qu'ils ne le sont d'autres virus. L'identification d'un nombre de plus en plus important de nouveaux SIV a permis d'observer différents modes d'évolution incluant entre autres la co-évolution virus/hôte, la transmission de virus d'une espèce à l'autre et la recombinaison entre virus divergents (161). Cette évolution est d'autant plus complexe que les virus recombinants qui sont transmis à d'autres espèces peuvent à leur tour co-évoluer avec leur nouvel hôte et masquer ainsi leur origine initiale. C'est le cas par exemple du SIVcpz du chimpanzé (*Pan troglodytes*) qui est en fait un produit d'anciens événements de recombinaison entre précurseurs des SIVrcm du Cercocèbe à collier blanc (*Cercocebus torquatus*) et ceux de la lignée SIVgsn/mus/mon du singe hocheur (*Cercopithecus nictitans*), du moustac (*Cercopithecus cephus*) et du cercopithèque mona (*Cercopithecus mona*) (35). Le chimpanzé à la particularité de chasser d'autres primates (colobes et autre petits singes) pour se nourrir et il est très possible qu'il ait acquis le ou les virus à l'origine du SIVcpz à travers cette pratique (267, 383). Néanmoins, les mécanismes exacts de ces transmissions et/ou recombinaisons restent inconnus.



Photo 22. Moustac (*Cercopithecus cephus*). Réalisée par les chercheurs de l'UMR-145 IRD.

Il est maintenant clairement établi que les HIV-1 et 2 résultent respectivement de la transmission à l'homme du SIVcpz du chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) dans l'ouest de l'Afrique centrale et du SIVsmm du mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) en Afrique de l'ouest (93, 102, 145, 161, 438). L'exposition au sang infecté à par la chasse et la consommation de la viande de brousse est probablement l'une des voies de transmission de ces virus à l'homme (161). Une récente étude réalisée au Cameroun montre que les populations locales sont exposées à une importante diversité de SIV à travers la chasse et la

consommation de primates (304), mettant ainsi en évidence la possibilité de transmission d'autres virus simiens du singe à l'homme à travers ces contacts. Il est actuellement démontré que les SIVcpz et SIVsmm ont été transmis à l'homme à différentes occasions, mais le potentiel de transmission d'autres SIV à l'homme reste très peu connue. Néanmoins, le fait que le SIVcpz résulte d'anciens événements de recombinaisons entre les ancêtres du virus du cercocèbe à collier blanc (SIVrcm) et des virus infectant le singe hocheur, le moustac et le cercopithèque mona (SIVgsn/mus/mon), cumulé au fait que le singe hocheur et le moustac représentent une importante proportion des singes chassés et consommés en Afrique centrale (304), soulignent la nécessité d'une surveillance épidémiologique particulière. Afin d'évaluer les risques de transmission à l'homme des virus de ces primates couramment chassés, il est important d'étudier plus en détail les prévalences, la diversité génétique et les caractéristiques biologiques de ces SIV chez leurs hôtes et dans leur environnement naturels.

Malgré l'importance des virus de la lignée SIVgsn/mus/mon dans l'évolution des SIV et l'origine du HIV-1, très peu de souches ont été identifiées et caractérisées à ce jour comparé aux nombres d'isolats caractérisés pour SIVagm, SIVmnd, SIVsm, etc. En effet, seulement trois isolats ont été caractérisés pour SIVgsn dont deux en génome complet, deux isolats ont été caractérisés pour SIVmon et un seul pour SIVmus (40, 95, 98). Beaucoup de questions soulevées par l'identification de ces trois virus restent encore sans réponse, parmi lesquelles l'origine du gène *vpu* qu'ils portent, gène jusqu'à lors spécifique aux virus de la lignée SIVcpz/HIV-1, soulignant encore plus la nécessité de caractériser de nouveaux variants SIVgsn/mus/mon. Dans la présente étude, nous avons caractérisé cinq souches SIVmus infectant des moustacs au Cameroun, parmi lesquelles trois souches nouvellement identifiées.

II. Matériel et Méthodes

Echantillons de primate. Cinq échantillons de moustac ont été utilisés pour la caractérisation de nouveaux SIVmus. Les cinq échantillons de sang total ont été collectés sur des moustacs sauvages morts, chassés au sud-est du Cameroun et destinés au commerce et à la consommation (viande de brousse). Cette collecte était effectuée par ponction cardiaque sur les animaux 12 à 72h après la mort et les autorisations étaient fournies par le Ministère Camerounais de l'Environnement, de la Forêt et de la Faune. Tous ont été identifiés lors de précédentes investigations que nous avons menées sur la diversité et la prévalence des infections à SIV chez les primates non-humains au Cameroun (5, 304). Quatre échantillons sur cinq (S1239, S1246, S2500 et S2573) avaient été analysés avec un test HIV, l'INNO-LIA HIV confirmation (Innogenetics, Gent, Belgique) et identifiés comme étant positifs par croisement avec les antigènes HIV-1/2. L'infection à SIV avait été confirmée pour deux de ces échantillons (S1239 et S1246) par PCR partielle dans la région *pol* et dans une récente étude portant sur la validation d'outils sérologiques pour la détection des SIV, décrite dans le chapitre précédent, les échantillons S2500, S2554 et S2573 régissaient très fortement avec les antigènes *rgp41* et *V3* de la lignée SIVgsn/mus/mon. L'échantillon S2554 a été identifié positif dans le cadre de cette étude (5).

Amplification et séquençage partiel des gènes *pol* et *env*. L'ADN total a été extrait du sang total avec la trousse d'extraction d'ADN de Qiagen (QIAGEN, Courtaboeuf, France) en suivant les instructions du fabricant. Pour les échantillons non encore confirmés par PCR, nous avons effectué une PCR de confirmation avec des amorces universelles et dégénérées NDR1/PolOR en 1^{er} *round* et Polis4/Uni2 en 2nd *round* en appliquant des conditions précédemment décrites (97). Le produit de cette PCR d'environ 650 pb couvrait l'extrémité 3' RT/intégrase du gène *pol*.

Parallèlement à l'utilisation des amorces universelles, nous avons développé d'autres amorces plutôt spécifiques à la lignée SIVgsn/mus/mon et permettant l'amplification de fragments de l'ordre de 2000 pb dans *pol* et *env*. Pour l'amplification du fragment *pol*, nous avons développé deux couples d'amorces donnant un produit final de 2050 pb (CNM.F1/PolOR2 en 1^{er} *round* et CNM.F2/CNM.R2 en 2nd *round*). Dans l'enveloppe, nous avons développé des amorces pour l'amplification d'un fragment de 2150 pb couvrant la boucle *V3* et la *gp41* (CNMenvF1/CNMenvR1 en 1^{er} *round* et CNMenvF2/CNMenvR2 en 2nd *round*) (Tableau 8). Ces nouveaux oligonucléotides ont été élaborés sur la base de séquences

SIVmus (01CMS1085), SIVgsn (99CM71, 99CM166) et SIVmon (99CMCML1, SIVmonNG1) déjà publiées (95, 98, 108). Pour ces PCR spécifiques, l'enzyme Long Expand PCR kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) était utilisée, avec un cycle de dénaturation manuel (92°C, 2 min) suivis de: 10 cycles de dénaturation (92° 15 s), d'hybridation (50°C 30 s) et d'élongation (68°C 3 min), le tout de nouveau suivi de 20 cycles avec cette fois un temps d'élongation de 3 min plus un incrément de 20 s par cycle. Une élongation finale à 68°C pendant 10 min était appliquée à la fin de la PCR. 5 µl du produit d'amplification du 1^{er} round étaient utilisés comme matrice au 2nd round avec les mêmes conditions PCR.

Tableau 8. Amorces utilisées pour l'amplification des génomes complets de SIVmus

Types d'amorces et round des PCR nichées	Fragment ^a	Amorces	Région	Taille (kb)	Séquences Amorces
<i>Universelle</i>					
1		NDR1 POLOR	<i>pol</i>	2,7	TRGAYACAGGRGCWGAYGA ACBACYGCNCCTTCHCCTTTC
2	A	POLIS4 UNI2	<i>pol</i>	0,65	CCAGCNCACAAAGGNATAGGAGG CCCCTATTCTCCCCTTCTTTTAAAA
<i>Spécifiques aux Lignée et/ou aux Souches SIV</i>					
1		CNM.F1 POLOR2	<i>pol</i>	2,75	TATCCYTCCYTGCATCYCTCTTT ACBACWGCCTTCWCCTTTCCA
2	B	CNM.F2 CNM.R2	<i>pol</i>	2,05	AATGGAGAATGYTMATAGATTTCCAG CCCCYATTCCTCCCCTTTTITTA
1		CNMenvF1 CNMenvR1	<i>env</i>	2,48	TGTGTSAAAYTRACHCCNATGTGTGT AACATNNCYTCYAGTCCTCYCTTTTYT
2	C	CNMenvF2 CNMenvR2	<i>env</i>	2,15	TCCTTYAAYCAGACYACAGARTTYAGRGA GGGATAGCCANGAATTNTCNCCAT
1		{ 1239F1 or 2500F1 CNMD1	<i>pol/GA/env</i>	2,7	TGGATTGTACTCACTTAGAAGGAAAAA GGACTGCACCCATTTAGAAGGAA CCWGTRAAATTTCATCATTGCATTITA
2	D	{ 1239F2 or 2500F2 CNMD2	<i>pol/GA/env</i>	2,3	CAGGGAGTAGTAGAAAACAAAAACAAA CACAGAGCCAAGGGGTAGTAGAA AGTATTGTATNGGRATCGGITGGAAG
1		{ 1239E1 or 2500L1 CNM.G1rev	<i>env/gag</i>	2,0	GTGGAGCAAGTTGGTGGATAATGA CTATCCCCAAACGCATCCGC TCAGCATCGCCGAGTGCCTCG
2	E	{ 1239Q1 or 2500L2 SPBSrev	<i>env/gag</i>	1 – 0,8	GGGAGGACTGGAAGGGATGTTTTA AGAAAAGGGAGGACTGGAAGGGAT CAAGTCCCTGTTCCGGGCGCC
1		{ 1239P1 or 2500P1 SPBS	<i>gag/pol</i>	2,5	ATTTTGCTGCCGTGATTGGAAG CCTCCTATGTTCCCTATTTCTCTG GGCGCCGAACAGGACTTG
2	F	{ 1239P2 or 2500P2 CNM.G1	<i>gag/pol</i>	2,2	CTTCTTGCTGGTCCCTGGTTATTTA GGAAGTGAAGAAGGCTGTGTAAGGC CGAGGCACTCGCGATGCTGA

^a Voir fig. 22B pour les stratégies détaillées des amplifications.
GA: Gènes accessoires.

Amplification de génomes complets *SIVmus*. Des génomes complets ont été amplifiés pour trois échantillons (S1239, S1246 et S2500), soit par amplification de l'ADN circulaire non-intégré (cas du S1246), soit par amplification de différents fragments se chevauchant (S1239 et S2500). Les stratégies PCR ainsi que les amorces utilisées pour l'amplification de ces génomes complets sont résumées dans les Figures 22A & B et dans le Tableau 8.

Pour l'isolat S1246, un fragment de 1984 pb a tout d'abord été amplifié dans *pol* à partir des oligonucléotides universels NDR1/PolOR en 1^{er} *round* et DR4/Uni2 en 2nd *round* dans les conditions précédemment décrites (95). A partir de ce fragment, des amorces spécifiques ont été conçues pour amplifier l'ADN circulaire non-intégré sur 8500 pb [1^{er} *round* 1246XLS1 (GGAATTCCAAGCTGTTGCATGGTG)/1246XLAS1 (CTCTAGAAGCTTGGCTGTTGTGG) et 2nd *round* semi-niché 1246XLS1/1246XLAS2 (AGCTGGTCCCATGTTGTTCACTG)] (Figure 22A). Pour cette PCR, nous avons utilisé l'enzyme Long Expand PCR kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), avec un cycle de dénaturation (92°C, 3 min) suivi de: 10 cycles de dénaturation (92°C 10 s), d'hybridation (57°C 30 s) et d'élongation (68°C 7 min), le tout de nouveau suivis de 20 cycles avec un temps d'élongation de 7 min plus un incrément de 20 s par cycle. Une élongation finale à 68°C pendant 10 min était appliquée à la fin de la PCR. 5 µl du produit d'amplification du 1^{er} *round* étaient utilisés comme matrice au 2nd *round* avec les mêmes conditions PCR. Après purification, ce long produit PCR était coupé avec des enzymes de restriction, et les différents fragments clonés et séquencés comme précédemment décrit (95).

Nous n'avons pas réussi à amplifier l'ADN circulaire non-intégré pour les isolats S1239 et S2500 et avons procédé par une stratégie d'amplification de fragments PCR se chevauchant pour l'obtention des génomes complets. Les différentes amorces ainsi que les stratégies d'amplification utilisées sont respectivement résumées dans le Tableau 8 et la Figure 22B. Pour toutes ces amplifications, nous avons utilisé l'enzyme Long Expand PCR kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) conformément aux instructions du fabricant. Environ 500 ng d'ADN génomique étaient utilisés pour le 1^{er} *round* de PCR et 5 µl du produit de ce 1^{er} *round* étaient utilisés comme matrice pour le second. Chaque réaction d'amplification incluait une dénaturation manuelle (92°C 2 min) suivie de 30 cycles de dénaturation-hybridation-élongation. Les températures d'hybridation étaient de 50°C et le temps d'élongation variait en fonction de la taille du fragment à amplifier, soit en général 1 min/1,5 kb. Les produits d'amplification ont été purifiés sur gel d'agarose et séquencés par la méthode de terminateur de chaîne marquée avec le kit *Big Dye Terminator v 3.1* selon les

instructions du fabricant (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les séquences ont été générées par un séquenceur automatique à 16 capillaires (ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA). La vérification et l'assemblage de séquences en génome complet ont été effectués avec SeqMan II (DNASTAR, Madison, WI).

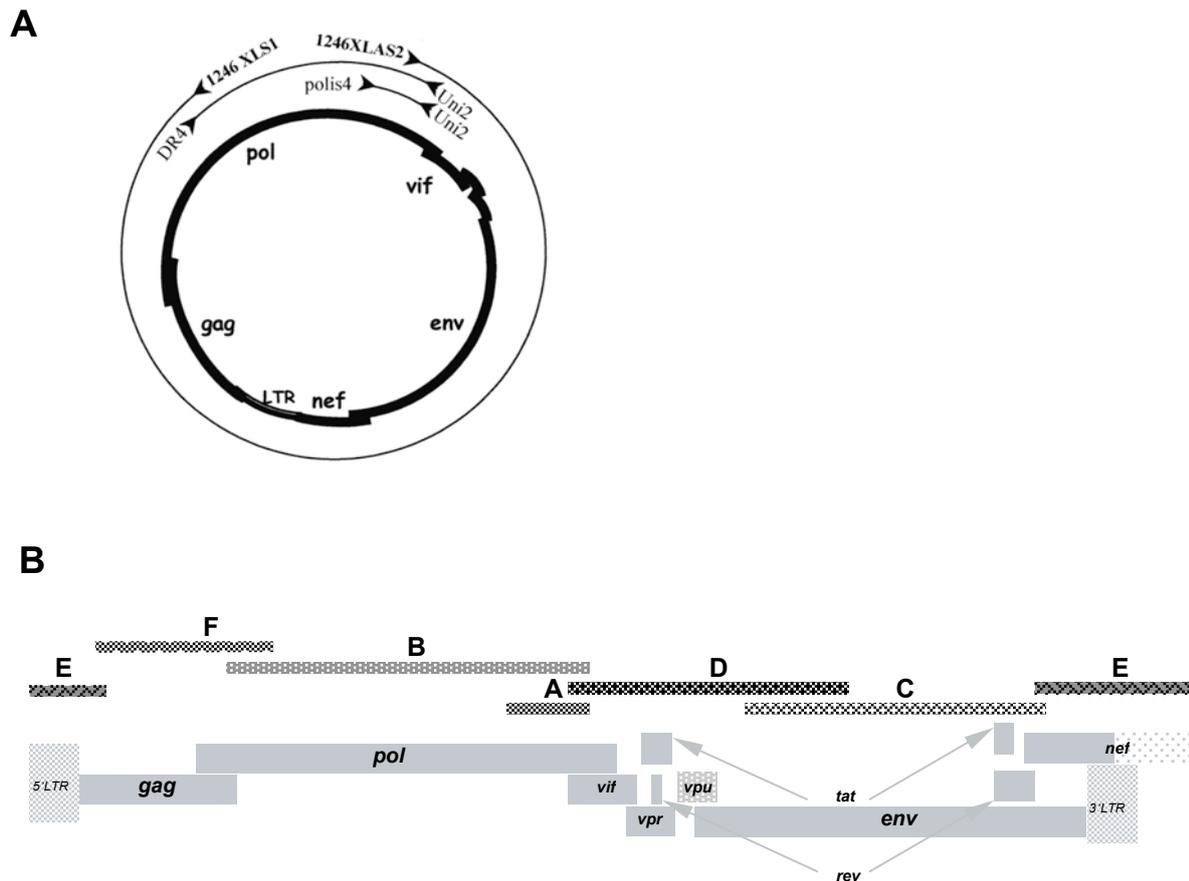


Figure 22. (A) Amplification des génomes complets de SIVmus à partir de sang total. L'ADN circulaire non-intégré a été amplifié pour le SIVmus.01CMS1246. (B) Une stratégie d'amplification de fragments contigus se chevauchant a été utilisée pour l'amplification des génomes complets de SIVmus.01CMS1239 et SIVmus.01CMS2500 avec des amorces décrites dans le Tableau 8.

Analyses phylogénétiques. Les séquences protéiques des différents isolats ont été déduites par concaténation des produits des gènes *gag*, *pol*, *vif*, *env* et *nef*, après exclusion des extrémités carboxyles *gag*, *pol*, et *env* chevauchant *pol*, *vif* et *nef* respectivement. L'alignement des séquences nucléotidiques et protéiques avec des séquences de référence a été effectué avec Clustal X (392), avec quelques ajustements mineurs manuels. Les sites ne pouvant être correctement alignés et ceux présentant des insertions ou des délétions ont été exclus.

Les courbes de distance ont été réalisées avec des fenêtres de 300 aa et un incrément de 20 résidus par étapes avec Simplot v2.5 (234). Les souches SIVmus.01CMS1239, SIVmus.01CMS1246 et SIVmus.01CMS2500 ont été comparées à d'autres SIV isolés de cercopithèques : SIVmus.01CMS1085 (N° d'accension GenBank **AY340700**) du *C. cephus*, SIVgsn.99CM71 (**AF468658**) et SIVgsn.99CM166 (**AF468659**) du *C. nictitans*, SIVmon.99CMCML1 (**AY340701**) et SIVmonNG (**AJ549283**) du *C. mona*, SIVsyk173 (**L06042**) et SIVsykKE51 (**AY523867**) du *C. albogularis*, SIVdebCM5 (**AY523866**) et SIVdebCM40 (**AY523865**) du *C. neglectus* et SIVden (**AJ580407**) du *C. mona denti*. Les arbres phylogénétiques ont été réalisés sur les séquences d'acides aminés par la méthode de maximum de vraisemblance incluse dans le programme de phylogénie MrBayes basé sur la probabilité de distribution postérieure des arbres (179), les paramètres étant définie par le model d'évolution des protéines de Jones, Taylor et Thornton avec une distribution gamma affectée aux sites et un nombre de génération égal à 1 million (195, 442). Les paramètres et les vraisemblances Bayésiennes ont été analysés avec le programme Tracer et toutes les tailles d'échantillons estimées étaient supérieures à 1000. Les distances génétiques entre les différentes souches pour chaque région du génome ont été déterminées en additionnant les longueurs des branches des arbres dans les régions concernées.

III. Résultats

Amplification et analyse de séquences partielles de SIVmus. Lors de précédentes études, les échantillons 01CMS1239 et 01CMS1246 avaient été partiellement caractérisés dans *pol* sur 650 pb avec les amorces universelles NDR1/PolOR – Polis4/Uni2 (95). Toutes les PCR réalisées avec ces amorces universelles étaient négatives pour les échantillons 01CMS2500, 01CMS2554 et 01CMS2573. Nous avons tout d’abord pensé à une dégradation du matériel génétique, mais les analyses de vérification n’ont pas confirmé cette dégradation (données non présentées). Nous avons donc développé dans la région *pol*, des amorces spécifiques aux virus de la lignée SIVgsn/mus/mon (CNM.F1/PolOR2 et CNM.F2/CNM.R2) (Tableau 8) avec lesquels nous avons amplifié un fragment de plus grande taille (2050 pb) dans *pol* pour les cinq échantillons étudiés. De la même manière, nous avons développé des amorces spécifiques dans la région *env* qui nous ont permis d’amplifier un fragment de 2150 pb pour trois échantillons: 01CMS1246, 01CMS1239 et 01CMS2500. Nous n’avons pas réussi à amplifier ce fragment pour les échantillons 01CMS2554 et 01CMS2573. Les résultats de ces amplifications partielles sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 9):

Tableau 9. Résultats des amplifications partielles par PCR dans les régions *pol* et *env* avec des amorces universelles et des amorces spécifiques aux SIVmus.

Echantillons	PCR		
	<i>pol</i>		<i>env</i>
	NDR1/PolOR Polis4/Uni2 650 pb	CNM.F1/PolOR2 CNM.F2/CNM.R2 2050 pb	CNMenvF1/CNMenvR1 CNMenvF2/CNMenvR2 2150 pb
01CMS1239	Pos	Pos	Pos
01CMS1246	Pos	Pos	Pos
01CMS2500	Neg	Pos	Pos
01CMS2554	Neg	Pos	Neg
01CMS2573	Neg	Pos	Neg

Les résultats des PCR nous ont permis d’une part, de confirmer l’infection à SIV pour les individus 01CMS2500, 01CMS2554 et 01CMS2573, cette confirmation ayant déjà été faite pour 01CMS1239 et 01CMS1246 et d’autre part, de réaliser des analyses phylogénétiques dans *pol*. Ainsi, à partir des séquences *pol* de 2050 pb obtenues grâce aux amorces spécifiques, nous avons réalisé un arbre phylogénétique de 2000 pb incluant ces cinq nouveaux variants SIVmus ainsi que diverses souches HIV et SIV connues (Figure 23). Les analyses phylogénétiques ont montré que les cinq nouvelles souches SIVmus se groupaient

avec les virus de la lignée SIVgsn/mus/mon, mais avec cette fois un nouvel élément: la formation d'un second groupe de virus SIVmus à l'intérieur de cette lignée. En effet, comme le montre la Figure 23, nous avons observé dans cette lignée deux groupes SIVmus, l'un formé par 01CMS1085 et 01CMS1239 et l'autre formé par 01CMS1246, 01CMS2500, 01CMS2554 et 01CMS2573. Afin de mieux étudier la phylogénie de ces deux groupes de virus SIVmus, nous avons décidé de caractériser deux représentants de chacun de ces groupes en procédant à l'amplification des génomes complets.

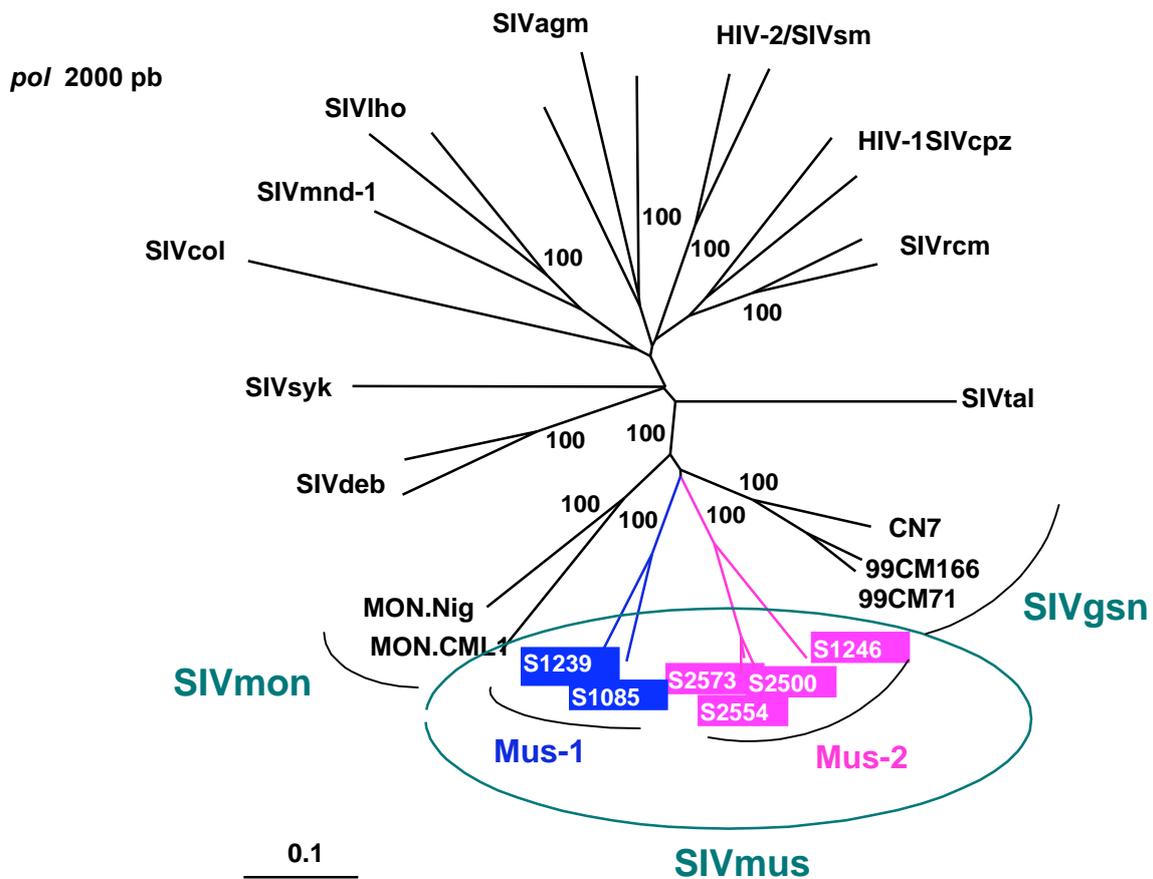


Figure 23. Arbre phylogénétique des séquences partielles *pol* (2000 pb) en acides nucléiques par la méthode du plus proche voisin (Saitou and Nei, 1987). Les deux groupes de SIVmus (Mus-1 et Mus-2) sont représentés par des couleurs distinctes (bleu et rose). Les valeurs des bootstraps sont marquées sur les nœuds.

Caractérisation des génomes complets de SIVmus. Un seul isolat, le 01CMS1239, a été amplifié en génome complet dans le groupe SIVmus formé par 01CMS1085 et 01CMS1239, le 01CMS1085 ayant déjà été caractérisé en génome complet dans une précédente étude (95). Dans le second groupe SIVmus, nous avons sélectionné les isolats 01CMS1246 et 01CMS2500 pour être caractérisés en génome complet, les souches 01CMS2554 et 01CMS2573 étant très proches de 01CMS2500 (Figure 23).

Pour l'échantillon 01CMS1246, un fragment de 1984 pb a tout d'abord été amplifié dans *pol* avec les amorces (NDR1/PolOR en 1^{er} round et DR4/Uni2 en 2nd round) afin d'obtenir une séquence assez longue pour l'élaboration d'amorces spécifiques. A partir de ce fragment de 1984 pb, nous avons conçu des amorces spécifiques (1246XLS1, 1246XLAS1 et 1246XLAS2) avec lesquels l'ADN circulaire non-intégré a été amplifié (Figure 22A). Le produit de cette PCR d'environ 8500 pb a été purifié sur gel d'agarose, coupé en fragments d'environ 2000 pb avec des enzymes de restriction, cloné et séquencé comme précédemment décrit (95). Pour les deux échantillons 01CMS1239 et 01CMS2500, nous n'avons pu amplifier l'ADN circulaire non-intégré et avons opté pour une amplification de fragments se chevauchant couvrant toute la longueur du génome (Figure 22B). Les différentes amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 8. Tout d'abord, les fragments B et C respectivement dans *pol* et *env* ont été amplifiés avec des amorces spécifiques à la lignée SIVgsn/mus/mon. Des amorces spécifiques, dessinées à partir de B et C ont permis d'amplifier le fragment D et de faire ainsi la jonction entre *pol* et *env*. Ensuite, le fragment E couvrant l'extrémité 3'*env*, *nef*, le *LTR* et l'extrémité 5' *gag* a été amplifié avec des amorces spécifiques issues du fragment C et d'une amorce universelle (SPBSrev). Enfin, le fragment F recouvrant *gag* a été amplifié à partir d'amorces spécifiques issues de B et d'une amorce universelle (SPBS), achevant ainsi l'amplification des génomes entiers. Les fragments amplifiés ont été purifiés, directement séquencés et assemblés avec le logiciel SeqMan II (DNASTAR, Madison, WI), afin d'obtenir des séquences contiguës. Nous avons obtenu des génomes complets de 9484 pb, 9508 pb et 9430 pb respectivement pour 01CMS1246, 01CMS1239 et 01CMS2500.

L'organisation génomique des nouvelles séquences était similaire à celle des virus des lignées SIVcpz/HIV-1 et SIVgsn/mus/mon (Figure 3A), c'est-à-dire, 3 fenêtres de lecture pour les principaux gènes *gag*, *pol* et *env*; 5 fenêtres de lecture pour les gènes accessoires *vif*, *vpr*, *tat*, *rev* et *nef*; et 1 fenêtre de lecture pour le gène accessoire *vpu*, spécifique aux virus de ces deux lignées. Afin de mieux définir la phylogénie de ces nouveaux isolats et confirmer ou non l'existence de deux groupes de virus "Mus" dans l'espèce *C. cephus*, nous avons réalisé plusieurs analyses phylogénétiques incluant des courbes de diversité, des arbres phylogénétiques et des calculs de distance génétique.

Analyses phylogénétiques des génomes SIVmus

Courbes de distance. Des courbes de distances ont été réalisées afin de comparer les nouveaux SIVmus (01CMS1239, 01CMS1246 et 01CMS2500) à d'autres SIV déjà caractérisés (Figure 24).

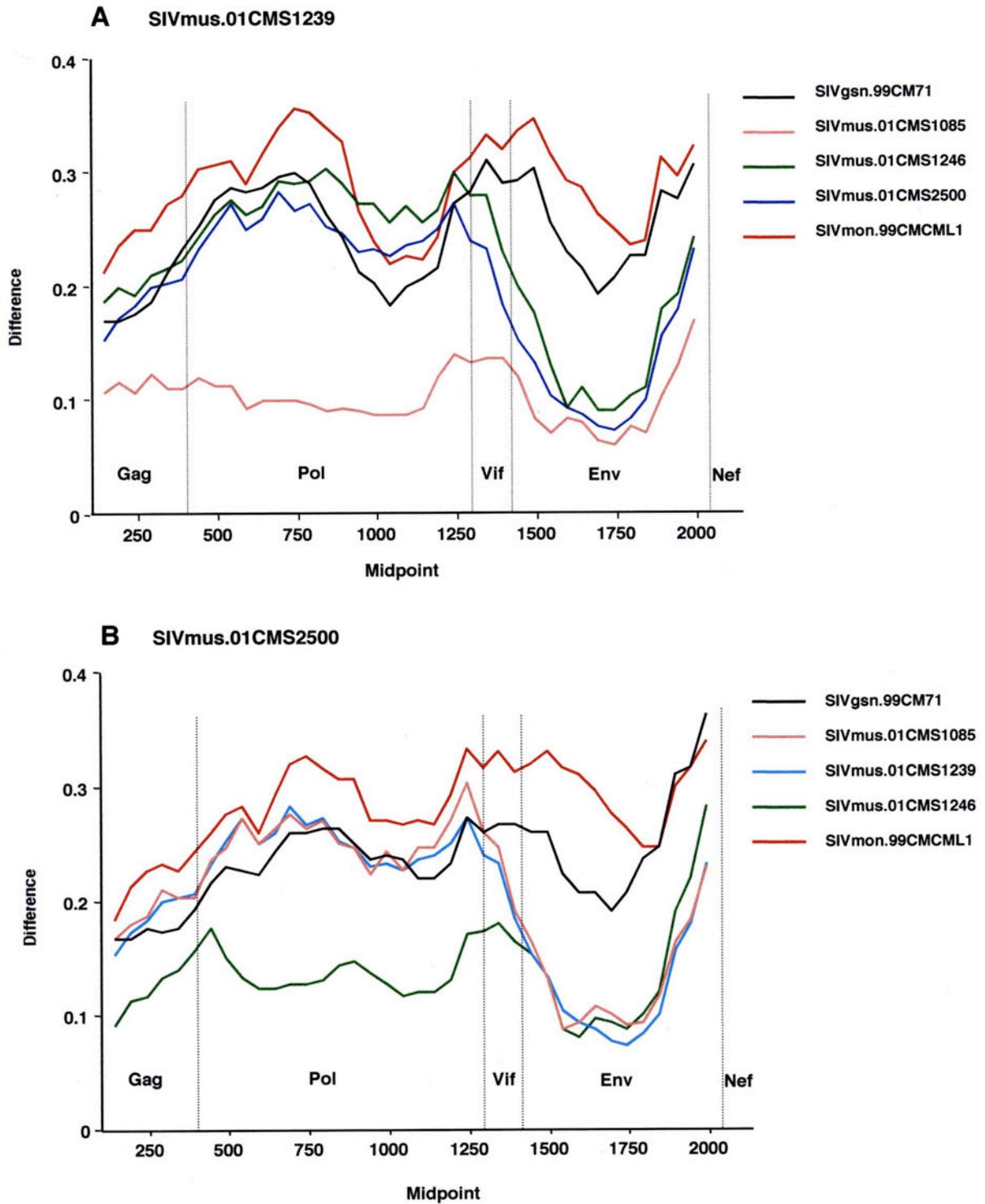


Figure 24. (A) Courbes de diversité des séquences protéiques concaténées illustrant le degré de différence génétique entre SIVmus.01CMS1239 et d'autres SIV; (B) et entre SIVmus.01CMS2500 et d'autres SIV. La proportion des différences de séquence d'acide aminé entre le SIV étudié et les autres SIV est représentée par différentes couleurs. Les valeurs de ces différences sont tracées dans des fenêtres de 300 aa, avec un pas de 20 aa par déplacement sur l'axe des x. La différence entre les protéines virales est indiquée sur l'axe des y (0,1 = 10% de différence).

Sur ces courbes, la différence entre les séquences était représentée sur l'axe des y (axe vertical) et les points de correspondance sur les séquences étaient représentés sur l'axe des x (axe horizontal). Ainsi, plus l'écart entre les courbes était grand, plus la différence était importante. Nous avons observé sur ces courbes une nette similitude entre 01CMS1085 et 01CMS1239 tout au long de leur génome (Figure 24A). Par contre, si dans la partie Gag-Pol 01CMS1085 et 01CMS1239 étaient exclusivement proches l'un de l'autre, dans la partie 3' (Env) de leur génome ils étaient équidistants de 01CMS1246 et 01CMS2500. Sur la seconde courbe de distance (Figure 24B), nous avons fait la même observation pour 01CMS2500 et 01CMS1246. En effet, dans Gag-Pol, ces deux virus étaient très proches l'un de l'autre, mais étaient équidistants de 01CMS1085 et 01CMS1239 dans Env. En résumé, les courbes de distance ont montré l'existence de deux groupes de virus SIVmus dans la région Gag-Pol et des virus « *Mus* » équidistants les uns des autres dans Env.

Arbres phylogénétiques. Pour analyser plus en détail les relations phylogénétiques entre les SIVmus et d'autres SIV, des arbres se chevauchant ont été réalisés sur les génomes complets. Ces arbres partiels se chevauchant ont permis d'identifier quatre régions du génome présentant des phylogénies différentes pour une ou plusieurs souches: Gag (aa 1-380), Pol1 (aa 381-896), Pol2 (897-1281) et Env (1415-2057) (Figure 25). Dans Gag, Pol1, Pol2 et Env, c'est-à-dire sur la totalité du génome, 01CMS1085 et 01CMS1239 formaient un groupe monophylétique (Figure 25). Dans Gag, Pol1 et Pol2, 01CMS1246 et 01CMS2500 étaient plus proches l'un de l'autre que des autres SIV (Figures 25A.B.C), mais ne l'étaient plus dans Env. Dans cette partie du génome, 01CMS1246 et 01CMS2500 étaient équidistants de 01CMS1085 et 01CMS1239, corroborant ainsi les résultats obtenus avec les courbes de distance. De plus, sur les arbres phylogénétiques, nous avons observé une évolution irrégulière des deux groupes SIVmus par rapport aux autres groupes SIV en fonction de la région du génome. En effet, les deux groupes SIVmus formaient un groupe monophylétique uniquement dans la région Pol1 (Figure 25B). Dans Pol2, 01CMS1246 et 01CMS2500 formaient un groupe monophylétique avec SIVgsn (Figure 25C) et dans Gag, la relation entre les groupes SIVmusS1085/S1239, SIVmusS1246/S2500, SIVgsn et SIVmon étaient assez ambiguë (Figure 25A). Même dans Pol1 où les deux groupes SIVmus formaient un groupe monophylétique, la topologie de l'arbre était très différente de celle de Env où ils se groupaient ensemble. Pour mieux comprendre l'évolution de ces quatre groupes de virus (les 2 groupes SIVmus et les groupes SIVgsn et SIVmon), nous avons calculé et comparé les distances génétiques entre les souches et les groupes de virus de cette lignée.

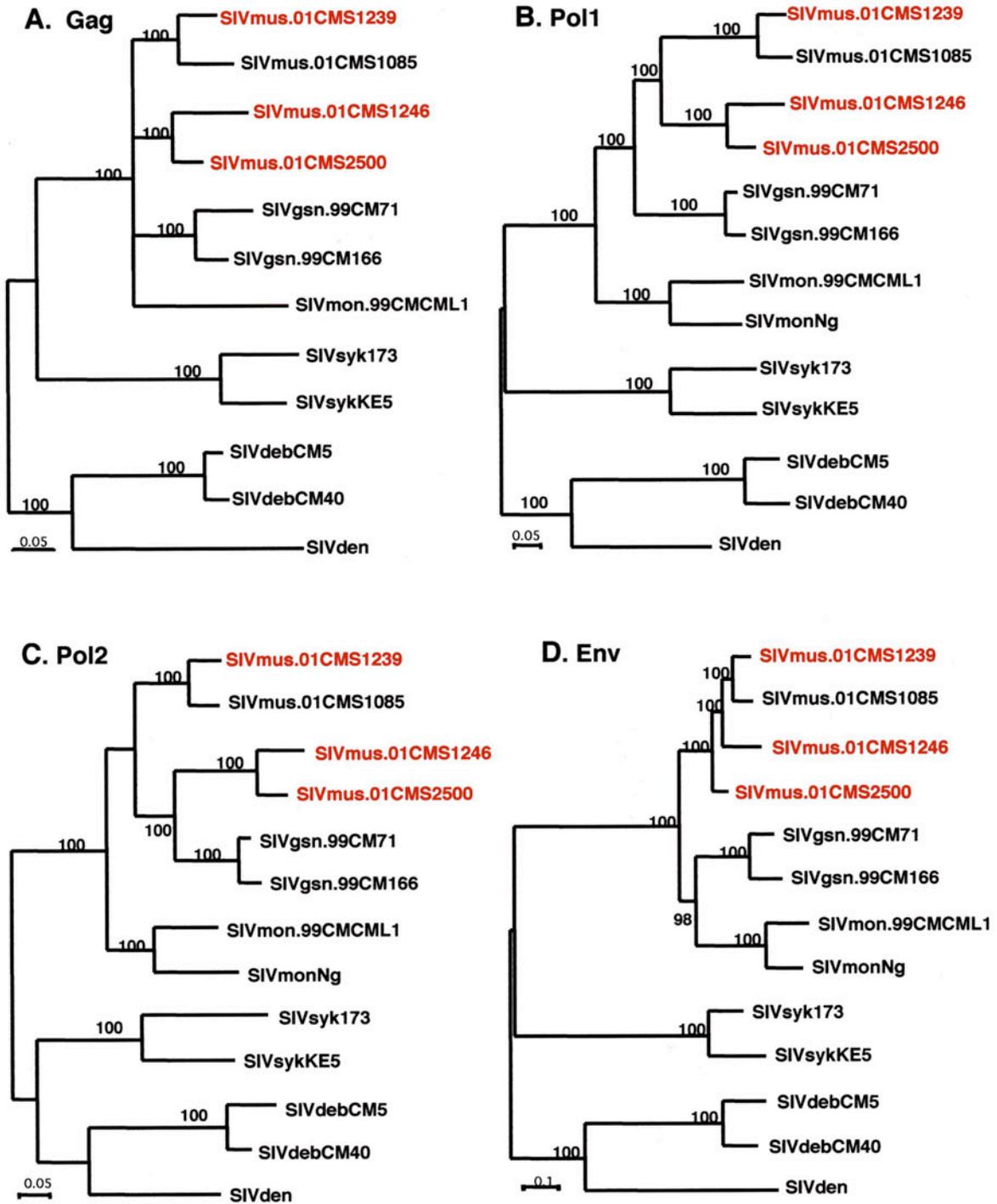


Figure 25. Arbres phylogénétiques des séquences protéiques des régions Gag (aa 1-380), Pol 1 (aa 381-896), Pol 2 (aa 897-1281) et Env (aa 1415-2057), illustrant la phylogénie de deux groupes SIVmus par rapport aux autres SIV. Arbres estimés sur le modèle d'évolution des protéines de Jones, Taylor et Thornton (Jones et al. 1992). Les identifiants en rouge représentent les nouveaux SIVmus caractérisés en génomes complets.

Distances génétiques. Les distances génétiques entre les différents groupes ont été calculées en sommant les longueurs des branches des arbres de la Figure 25. Le Tableau 10 résume les résultats de ces calculs, où A est la somme des longueurs de branches entre 01CMS1085 et 01CMS1239 pour chacun des quatre arbres Gag, Pol1, Pol2 et Env, de même pour B (S1246/S2500), C (71/166) et D (CML1/NG). La région Gag de SIVmonNG n'étant pas publiée en totalité, nous n'avons pu effectuer de calcul dans cette région pour D. A vs C représentait par exemple la longueur de branche moyenne entre SIVmusS1085 et SIVgsn71, SIVmusS1085 et SIVgsn166, SIVmusS1239 et SIVgsn71, et SIVmusS1239 et SIVgsn166. De même pour B vs C, A vs D, B vs D et C vs D. Les comparaisons A, B, C et D représentaient les comparaisons à l'intérieur de chaque espèce, tandis que A vs B, A vs D, B vs C, B vs D et C vs D représentaient les comparaisons inter-espèces. A vs B, c'est-à-dire la longueur de branches moyenne entre SIVmus-1 et SIVmus-2 était le cas qui nous intéressait le plus, dans la mesure où cette comparaison permettrait de mieux définir les relations entre les deux groupes SIVmus.

Tableau 10. Distances génétiques obtenues en sommant les longueurs des branches des arbres de la figure 25 dans les différentes régions Gag, Pol 1, Pol 2 et Env. Les lettres A, B, C et D sont les sommes des branches des arbres respectivement pour les groupes SIVmusS1239/S1085, SIVmusS1246/S2500, SIVgsn et SIVmon. La comparaison entre les groupes (exemple A vs B) est déterminée en calculant la longueur moyenne des branches entre les différents virus des groupes comparés.

	Gag	Pol1	Pol2	Env	
A: SIVmus 1239 vs 1085	0.12	0.12	0.10	0.11	
B: SIV mus 1246 vs 2500	0.14	0.15	0.13	0.18	
C: SIV gsn 71 vs 166	0.12	0.06	0.06	0.15	Intra-espèces
D: SIVmon CLM1 vs NG		0.27	0.23	0.22	
A vs B: mus1 vs mus2	0.24	0.43	0.38	0.19	?
A vs C: mus1 vs gsn	0.26	0.48	0.32	0.46	
B vs C: mus2 vs gsn	0.26	0.44	0.32	0.44	
A vs D: mus1 vs mon	0.31	0.62	0.37	0.53	Inter-espèces
B vs D: mus2 vs mon	0.32	0.59	0.49	0.51	
C vs D: gsn vs mon	0.33	0.53	0.43	0.51	

Ainsi, nous avons constaté que dans Env, la distance entre A et B était comparable aux distances intra-espèces, alors que dans Gag, Pol1 et pol2, les distances entre les deux groupes SIVmus (A et B) étaient plus similaires aux distances inter-espèces (Tableau 10). En supposant que la vitesse d'évolution de ces virus soit similaire, ces résultats de distances génétiques entraînaient une évidence: la région Env représenterait la vraie lignée SIVmus, mais par contre dans Gag et Pol, cette lignée était à reconsidérer.

En résumé, les résultats des courbes de diversité, des arbres phylogénétiques et des calculs des distances génétiques ont mis en évidence l'existence de trois groupes de virus approximativement équidistants dans le région Env (SIVmus, SIVgsn et SIVmon) et de quatre groupes de virus dans la région Gag-Pol (SIVmusS1085/S1239, SIVmusS1246/S2500, SIVgsn et SIVmon). D'autre part les arbres phylogénétiques ont montré le caractère mosaïque des virus du group SIVmusS1246/S2500 qui dans une partie de Pol forme un groupe monophylétique avec SIVgsn, suggérant ainsi des événements de recombinaison entre SIVmusS1246/S2500 et SIVgsn. Ces évènements de recombinaison entre SIVmus et SIVgsn ne semblent pas être les seuls impliqués dans l'origine et l'évolution de ces deux groupes de virus de *C. cephus*. En effet, les analyses phylogénétiques ont montré qu'une seule lignée SIVmus était retrouvée dans Env, et que cette lignée était dupliquée dans Gag-Pol en deux groupes distincts. Ceci implique que l'un des deux groupes SIVmus est le groupe d'origine et que l'autre est un virus SIVmus qui a conservé sa partie Env, mais a acquis la région Gag-Pol d'un autre virus, SIVx, à travers des événements de combinaison.

Si nous supposons que SIVmusS1246/S2500 est le groupe d'origine de ces virus, alors le groupe SIVmusS1085/S1239 serait un recombinant entre SIVmus et un SIVx, avec le point de recombinaison situé entre *vif* et *env*. Nous n'avons identifié aucune lignée SIV parmi celles connues, formant un groupe monophylétique avec le groupe SIVmusS1085/S1239 dans la région Gag-Pol, ce qui suggère que le SIVx est pour le moment inconnu. Ainsi, le groupe SIVmusS1085/S1239 représente dans Gag-Pol le virus SIVx inconnu, provenant d'un primate X, et est le résultat d'évènements de transmissions inter-espèces et de recombinaisons au cours desquels le SIVmus de *C. cephus* aurait acquis la région *gag-pol* du SIVx pour donner naissance à l'ancêtre des virus SIVmusS1085/S1239. Pour illustrer cette hypothèse, nous avons inclus l'hypothétique SIVx dans les arbres de la Figure 25 (Figure 26). Sur ces arbres imaginaires, nous avons observé dans Env quatre groupes phylogénétiques distincts, SIVx, SIVmus, SIVgsn et SIVmon. Dans Gag-Pol, SIVmusS1085/S1239 et SIVx formaient un groupe monophylétique, renforçant l'hypothèse de l'existence d'un SIVx à l'origine du second groupe SIVmus.

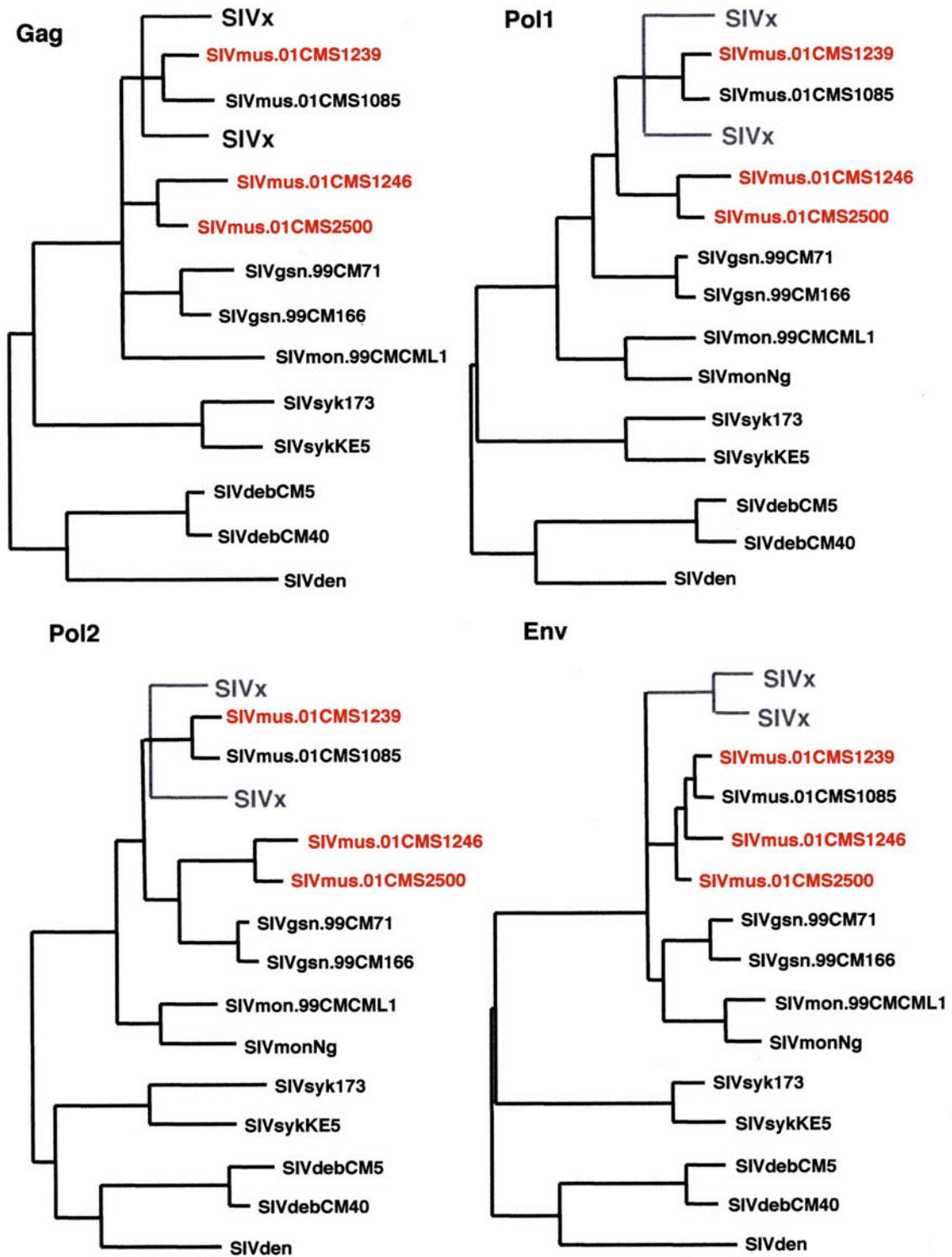


Figure 26. Hypothétiques arbres phylogénétiques illustrant l'existence d'un SIVx à l'origine de l'un des groupes SIVmus.

Ainsi, nous avons identifié pour la première fois, un second groupe de SIV dans l'espèce *C. cephus*, portant ainsi à deux le nombre d'espèces de primates africains infectés par plusieurs types de virus. Le mandrill (*Mandrillus sphinx*) est le premier primate non-humain chez lequel deux lentivirus différents ont été décrits, le SIVmnd1 et le SIVmnd2 (371, 384). Le SIVmnd1 a été décrit chez les mandrills vivant au sud de la rivière Ogooué au Gabon et le SIVmnd2 chez les mandrills vivant dans la région allant de la rivière Ogooué au sud Cameroun. La présente étude est la première à décrire l'existence de deux groupes de virus chez des primates de la même espèce occupant un même territoire.

Analyse du gène vpu. L'identification de nouveaux variants SIV appartenant à la lignée SIVgsn/mus/mon, seule lignée naturellement porteuse d'un gène *vpu* avec la lignée SIVcpz/HIV-1, était pour nous l'occasion de re-évaluer la diversité de ce gène dont l'origine reste inconnue. Nous avons donc comparé plusieurs séquences Vpu déjà publiées de HIV-1, SIVcpz, SIVgsn, SIVmus, SIVmon et du tout récemment caractérisé SIVden (108) avec celles des SIVmus nouvellement identifiés (Figure 27). Comme précédemment décrit, nous avons observé une importante variabilité du Vpu au niveau de sa séquence et de sa taille que ce soit dans la région transmembranaire ou au niveau des hélices α du domaine cytoplasmique. Cependant, nous avons identifié plusieurs résidus et motifs assez conservés, entre autres l'acide aminé 23W (position définie par le HIV1-B HXB2) que nous avons retrouvé sur tous les Vpu des HIV-1 analysés, chez ceux des SIVcpz du *Pan t. troglodytes*, et aussi curieusement chez celui du SIVden. Ce tryptophane est impliqué dans la structure des canaux ioniques des Vpu HIV-1 (94). Par contre, pour tous les Vpu des SIVgsn/mus/mon, nous avons observé à la place de ce tryptophane, un résidu alanine rigoureusement conservé chez ces virus. Il serait intéressant de vérifier si ce résidu 23A joue le même rôle chez les virus de la lignée SIVgsn/mus/mon que le 23W chez le HIV-1. Les Vpu du HIV-1 sont principalement impliqués dans la libération des virus de cellules infectées et dans la dégradation des molécules CD4 (181). Cette dernière fonction est régulée par la phosphorylation des sérines en position 52 et 56 par rapport au HIV-1 (135, 300). Sur les Vpu HIV-1, SIVcpz, SIVgsn/mus/mon et SIVden que nous avons analysés, la 52S (sérine en position 52) était rigoureusement conservé, mais le 56S l'était uniquement pour les vpu HIV-1, les vpu SIVcpz du *Pan t. troglodytes* et chez le vpu SIVden (Figure. 27). Ces observations suggèrent que si les Vpu ont les mêmes fonctions chez tous les primates, la phosphorylation de la 56S n'y est pas indispensable comparée à celle de la 52S.

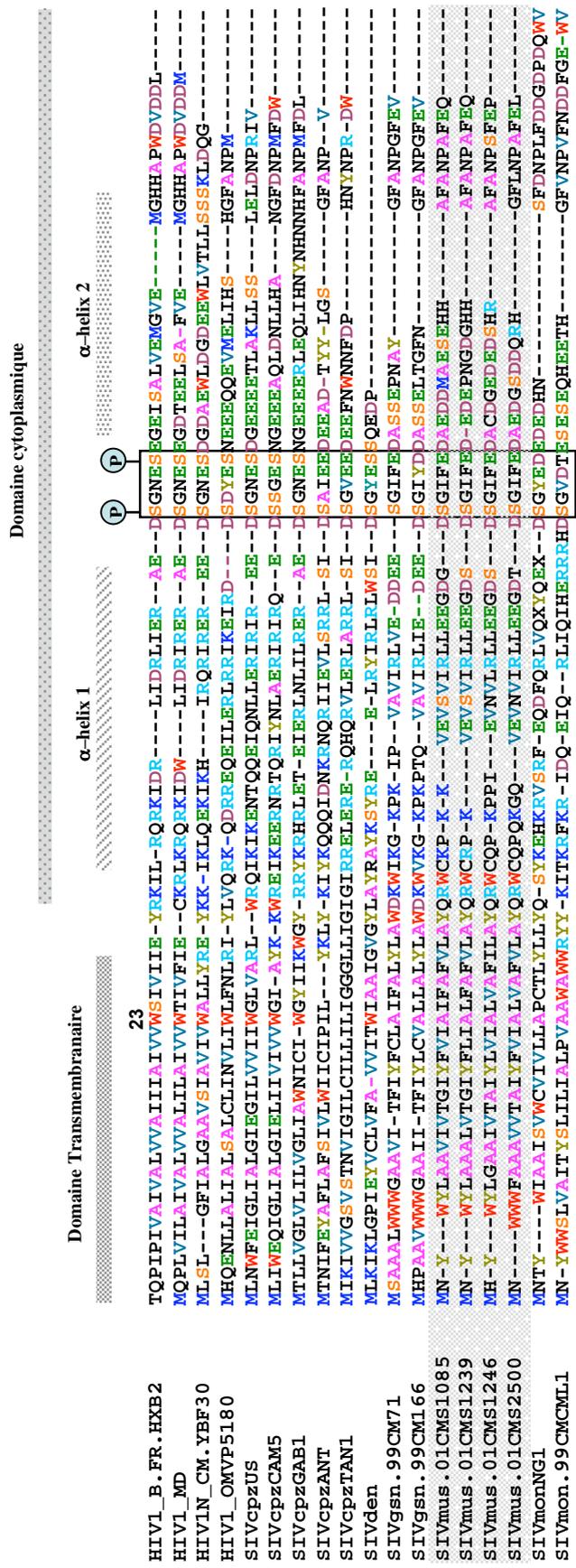


Figure 27. Alignement des séquences Vpu des virus SIVcpz/HIV-1, SIVgsn/mus/mon et SIVden. Les séquences SIVmus sont sur fond sombre. Les régions transmembranaires et cytoplasmiques, ainsi que les deux hélices α sont indiquées. La portion de l'alignement contenant les sérines phosphorylées S52 et S56 est encadrée. Le tryptophane conservé en position 23 chez les HIV-1, les SIVcpzPtt et chez le SIVden est indiquée par le chiffre 23. Les tirets sont introduits afin d'optimiser l'alignement.

SIVmus.01CMS1085	TALEKFIKDQALLNLWGCANRQIC
SIVmus.01CMS1239
SIVmus.01CMS1246V....I.....
SIVmus.01CMS2500
SIVgsn.99CM71	SS...YLR..TI.QA...QP..
SIVgsn.99CM166	SS...YLR..TI.QA...P..
SIVmon.99CMCL1	..V.....T...A...KAV..
SIVmonNG1	..V.....T...S...AV..
SIVcpzUS	L.V.RYL...QI.G...SGKT..
SIVcpzGAB	L.V.RYLQ..QI.G...SGKAV..
SIVcpzCAM3	L.V.RYLR..QI.G...SGKA..
SIVcpzCAM5	L.V.RYL...QI.S...SGKA..
HIV1B.HXB2R	L.V.RYL...Q..GI..SGKL..
HIV1N.YBF30	L.I.RYLR..QI.S...SGKT..
HIV1N.YBF106	L.I.RYLR..QI.S...SGKT..
SIVcpzANT	L.V..YLR..Q..S...DKVT..
SIVcpzTan1	L.V..Y.R..Q..S...KLV..
HIV10.MVP5180	Q...TL.QN.QR....KGKL..
SIVdeb.CNE5	..I..YL...SK..E...FK..
SIVdeb.CNE40	..I..YL...K..E...FK..
SIVsyk.173	...TYLR...I.SN...FK..
SIVsykKE51	...TYLR...IMSN...FK..
SIVagmTAN1	...YLE..TR.....FK.V..
SIVlho	...EYV.H....AS..QWK.V..
SIVmndGB1	.S..NY.....SQ...SWA.V..
SIVcolCGU1	ATI.GYLEE..K.ASI...M..

Figure 29. Alignement des séquences de la région immunodominante de la gp41 des SIVmus et celles d'autres HIV et SIV. Les cystéines conservées de la boucle Cys(X)₅₋₇Cys sont indiquées sur fond noir. Les pointillés représentent les résidus d'acide aminé identiques.

IV. Discussion

L'infection à HIV/SIDA est un véritable problème de santé publique, particulièrement en Afrique subsaharienne où l'on dénombre le plus grand nombre de personnes infectées, de malades et de décès (292). Les origines simiennes des HIV-1 et 2 respectivement du SIVcpz_{ptt} à l'ouest de l'Afrique centrale et du SIVsmm en Afrique de l'ouest ont été démontrées (161). Parallèlement, plusieurs études ont montré une importante diversité de lentivirus (SIV) circulant chez les primates africains, particulièrement ceux de la famille des *Cercopithecidae* ou petits singes (50). Nous avons récemment identifié et caractérisé une nouvelle lignée de lentivirus simiens, la lignée SIVgsn/mus/mon qui comprend le SIVgsn du *C. nictitans*, le SIVmus du *C. cephus* et le SIVmon du *C. mona*, la particularité de ces trois virus étant la présence d'un gène *vpu*, qui jusqu'à lors était spécifique à la lignée SIVcpz/HIV-1 (95, 98). L'identification de cette nouvelle lignée a modifié précédente phylogénie du SIVcpz, et plusieurs évidences montrent que le SIVcpz est un virus recombinant ayant pour origine d'anciens événements de recombinaison entre précurseurs du SIVrcm du Cercocèbe à collier blanc et des SIVgsn/mus/mon (35). Dans une récente étude menée au Cameroun, nous avons montré que les populations locales étaient exposées à une importante diversité de SIV à travers la chasse et la consommation de primates. Dans cette étude, nous avons aussi montré que les petits singes étaient majoritairement chassés, la plupart appartenant au genre *Cercopithecus*, dont plusieurs moustacs (*C. cephus*) (304), d'où la nécessité de caractériser davantage de lentivirus chez ces primates afin de mieux évaluer les risques de transmission et de propagation chez l'homme.

Le moustac (*Cercopithecus cephus*) est un petit singe africain dont l'aire de distribution couvre l'ensemble du domaine forestier compris entre la rivière Sanaga au Cameroun et le fleuve Congo-Oubangui (157). Ce primate fait partie des rares singes de l'ancien monde naturellement porteur d'un SIV arborant un *vpu*, le SIVmus. Dans cette étude, nous avons caractérisé cinq nouvelles souches SIVmus et pour la première fois, mis en évidence l'existence de deux groupes distincts de SIV dans cette espèce. La caractérisation de génomes complets représentant chacun de ces groupes SIVmus, nous a permis de mettre en évidence l'implication des transmissions inter-espèces et des recombinaisons dans l'origine et l'évolution des SIVmus. En effet, l'origine du second groupe SIVmus semble être le résultat de transmission inter-espèces de lentivirus entre *C. cephus* et un singe inconnu, suivi d'évènements de recombinaison au cours desquels le nouveau groupe SIVmus n'a conservé que sa partie 3' (*env*) et a acquis la partie *gag-pol* du virus inconnu. Au cours de ce travail,

nous avons aussi mis en évidence des transmissions inter-espèces et des recombinaisons entre virus de *C. cephus* (SIVmus) et *C. nictitans* (SIVgsn). Les transmissions inter-espèces et les recombinaisons sont parmi les principaux mécanismes impliqués dans l'origine et l'évolution des lentivirus des primates (161, 302). Ces mécanismes impliquent néanmoins que les primates concernés puissent être en contact, contacts favorisés par le chevauchement de territoires et des comportements sociaux particuliers.

Une caractéristique majeure, commune aux cercopithèques arboricoles, est la propension à vivre en troupes polyspécifiques. Des associations entre *C. nictitans*, *C. cephus* et *C. mona* ou *C. nictitans*, *C. cephus* et *C. pogonias* ont été rapportées (147). Ces associations polyspécifiques sont principalement destinées à faciliter la recherche alimentaire et sont aussi bénéfiques dans les situations de prédation. Par contre, elles peuvent considérablement favoriser des échanges de virus entre les espèces, à travers des morsures, griffures et autres contacts à risque. Des accouplements inter-espèces aboutissant à des hybrides ont été aussi décrits entre espèces et sous-espèces du genre *Cercopithecus*, et peuvent faciliter des échanges de virus (147). Les deux groupes SIVmus décrits dans cette étude sont le reflet de ce mode d'association, car leur phylogénie met en évidence des transmissions inter-espèces d'une part entre *C. nictitans* et *C. cephus*, mais aussi entre *C. cephus* et d'autres espèces infectées inconnues. Les co-infections favorisant généralement les recombinaisons entre lentivirus, même aussi divergents que ceux des primates non-humains, il n'est pas surprenant que nous ayons identifié des recombinants SIVgsn/SIVmus et SIVmus/SIVx dans cette lignée. D'autre part, ces transmissions inter-espèces ne sont pas des événements ponctuels et localisés, mais représentent un phénomène général chez ces populations de primate, car les virus décrits dans cette étude ont été identifiés sur des échantillons collectés dans différentes zones géographiques couvrant le sud-est du Cameroun (Figure 30). Nous n'avons pas identifié le primate porteur du SIVx, et encore moins le SIVx, cependant, en considérant le comportement social des *C. cephus*, l'un des primates souvent retrouvé en association avec cette espèce et chez lequel aucun SIV n'a encore été décrit est le *C. pogonias* (147). Dans une précédente étude, nous avons testé 70 échantillons provenant de *C. pogonias* et n'avons pu confirmer une infection à SIV chez ces primates. Quelques réactions croisées ont été observées avec des antigènes HIV-1/2, mais ces résultats n'ont pu être confirmés ni avec les ELISA SIV spécifiques, ni par PCR avec des amorces universelles (5). Il n'est pas impossible que le *C. pogonias* soit porteur de ce virus SIVx et que nous ne puissions l'identifier soit par manque de fiabilité des outils utilisés, soit à cause d'une très faible prévalence ou pour d'autres raisons non encore identifiées. Par ailleurs, d'autres

primates ne vivant pas en association polyspécifique avec le *C. cephus* pourraient tout aussi être porteurs naturels du SIVx, l'infection à SIV n'ayant pas encore été recherchée chez toutes les espèces de primate.

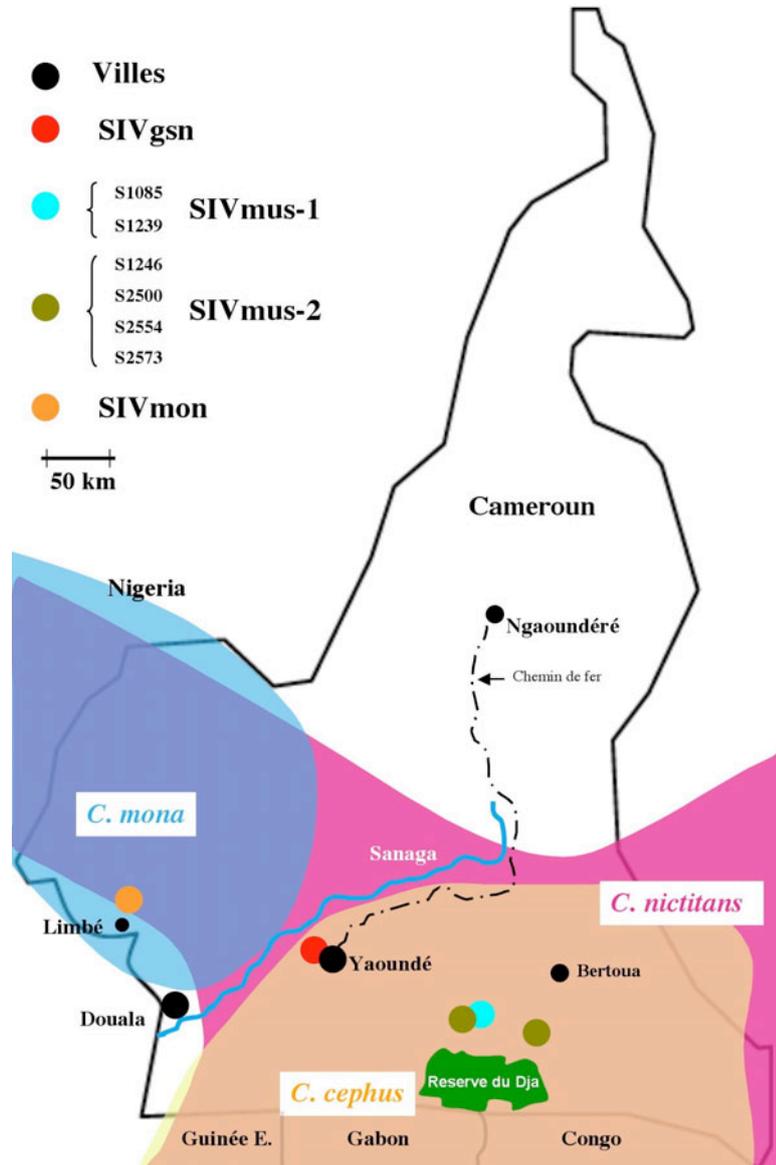


Figure 30. Distribution géographique des moustacs, singes hocheurs et cercopithèques mona au Cameroun. Les sites de collecte des échantillons de moustac (SIVmus) sont indiqués, de même que les sites d'origine des échantillons dans lesquels les SIVgsn et SIVmon ont été précédemment caractérisés. Le chemin de fer représente l'un des principaux modes de transport de la viande de brousse de l'Est du Cameroun vers la capitale Yaoundé.

Deux types de lentivirus ont déjà été décrits chez une autre espèce de primates non-humains, le mandrill (*Mandrillus sphinx*) (371, 384). Cependant, l'identification de deux groupes SIV chez les *C. cephus* reste originale car pour la première fois deux virus sont identifiés chez des primates de la même espèce occupant le même territoire naturel.

L'infection des mandrills par deux types de virus est décrite chez deux populations vivant sur des territoires distincts, le SIVmnd1 circulant chez les mandrills vivant au sud de la rivière Ogooué au Gabon, et le SIVmnd2 chez les mandrills retrouvés du nord de la rivière Ogooué au sud de la rivière Sanaga au Cameroun. Comme nous l'avons mis en évidence dans cette étude pour les deux groupes SIVmus, les transmissions inter-espèces et les recombinaisons sont aussi impliquées dans l'origine et l'évolution des SIVmnd1 et SIVmnd2 (371). En effet, on pense que le SIVmnd1 est le résultat de transmissions inter-espèces entre mandrills et primates de la super-espèce *Ihoesti*, en particulier ceux porteurs des virus de la lignée SIVlho/sun, *C. Ihoesti* et *C. solatus* respectivement. Le SIVmnd2 quant à lui résulterait de transmissions inter-espèces entre mandrills et cercocèbes à collier blanc (*Cercocebus torquatus*), suivies de recombinaisons entre SIVmnd1 et SIVrcm au cours desquelles le SIVmnd2 a acquis la partie 5' (gag-pol) du SIVrcm et conservé la partie env SIVmnd1 (371, 384, 388). Ces résultats montrent clairement l'implication des transmissions inter-espèces et des recombinaisons dans l'origine et l'évolution des lentivirus des primates africains.

En conclusion, l'origine et l'évolution des lentivirus des primates non-humains reste très complexe. Jusqu'à très récemment, on pensait que les primates africains étaient largement infectés par des SIV, mais dans une récente étude nous avons montré que les prévalences des infections à SIV variaient d'une espèce à l'autre (5). L'espèce *C. cephus* fait partie des espèces chez lesquelles nous avons montré que la prévalence est faible (3%), presque 10 fois moins que celle trouvée chez les singes verts d'Afrique, mangabeys enfumés, mandrills, colobes guéréza, ... (26, 51, 97, 194, 346, 371, 384). Cette faible prévalence peut résulter d'une récente introduction du virus dans l'espèce, de facteurs hôtes/virus ou de tout autre phénomène, mais les résultats de la présente étude montrent que malgré cette faible prévalence, l'origine et l'évolution des SIVmus sont tout aussi complexes. Les singes du genre *Cercopithecus* et particulièrement ceux de l'espèce *C. cephus* sont considérés comme étant encore en pleine évolution (147). Cette évolution de l'hôte associée au dynamisme des virus peuvent générer des nouveaux variants viraux capables de se propager plus rapidement dans l'espèce, voire contribuer à l'émergence de virus capables comme le SIVcpz et le SIVsmm d'engendrer de nouvelles zoonoses chez l'homme. D'autre part, la recombinaison HIV/SIV ne peut être exclue et pourrait faciliter l'émergence d'un nouveau lentivirus humain. La chasse et la consommation de ces primates représentent donc un risque majeur de santé publique et soulignent la nécessité d'élaborer des stratégies de sensibilisation et de surveillances épidémiologiques dans ces régions.

V. Publication

Un article présentant les résultats de ce travail est en cours de rédaction.

B. CAS DES MANDRILLS (*Mandrillus sphinx*)

I. Introduction

Le genre *Mandrillus* comprend deux espèces allopatriques, occupant des territoires séparés par la rivière Sanaga au Cameroun: le drill (*Mandrillus leucophaeus*) présent au sud-est du Nigeria, dans l'ouest Cameroun au nord-ouest de la Sanaga et sur l'île de Bioko, et le mandrill (*Mandrillus sphinx*) présent au sud Cameroun, en Guinée-équatoriale, dans la majeure partie du Gabon, jusqu'au sud du Congo Brazzaville (157). Des infections à SIV ont été décrites chez les Mandrills, avec des prévalences de l'ordre de 50% (5, 371, 384). Cependant, la singularité de l'infection à SIV chez le mandrill par rapport aux autres primates reste la présence de deux types de virus chez cette espèce: le SIVmnd1 et le SIVmnd2 (371, 384). Le SIVmnd1 a été décrit en premier chez les mandrills vivant au sud du Gabon et 10 ans plus tard le SIVmnd2 a été identifié chez les mandrill vivant au nord du Gabon et au sud Cameroun (371, 384, 400). Les mandrills porteurs du SIVmnd1 et ceux porteurs du SIVmnd2 sont séparés par la rivière Ogooué au Gabon.



Photo 23. Mandrill (*Mandrillus sphinx*).
<http://fr.wikipedia.org/>.

L'origine et l'évolution des SIVmnd1 et SIVmnd2 sont complexes. Dans la région *gag-pol*, le SIVmnd1 se groupe avec les virus du cercopithèque de l'Hoest (SIVlho) et du cercopithèque à queue de soleil (SIVsun) alors que le SIVmnd2 est lui apparenté au SIVrcm du cercocèbe à collier blanc dans cette région. Dans la région *env-nef*, les deux virus se groupent ensemble et avec la lignée SIVlho/sun. Ces observations suggèrent que des transmissions inter-espèces et/ou des recombinaisons impliquant des virus de la super-espèce *l'hoesti* (SIVlho et SIVsun) et le SIVrcm du cercocèbe à collier blanc ou un précurseur de ce virus sont à l'origine des SIVmnd1 et SIVmnd2 (45, 149, 167, 371, 384). Les circonstances et les mécanismes de ces transmissions et recombinaisons sont encore mal connus.

Le drill est une espèce très proche du mandrill qui vit dans l'ouest Cameroun entre la rivière Sanaga et la rivière Cross au Nigeria, et sur l'île de Bioko (157). Il est porteur d'un SIV, le SIVdrl dont la similitude avec le SIVmnd2 suggère une origine commune aux deux virus (83, 178, 371). Des séquences SIVdrl-like ont récemment été identifiées chez des mandrills et les auteurs de ces travaux ont émis l'hypothèse de transmissions inter-espèces de SIV entre mandrills et drills (178, 405). Cependant, il est difficile d'expliquer des transmissions récentes entre drills et mandrills dans la mesure où les habitats des deux espèces ne se chevauchent pas.

Tout comme le mandrill, le mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) appartient à la tribu *Papionini*. Ce primate est porteur d'un SIV, le SIVsmm à l'origine du HIV-2, l'un des virus responsables du sida chez l'homme (161, 171). L'organisation génomique des SIVmnd2, SIVsmm, SIVrcm et HIV-2 est similaire, avec la présence d'un gène accessoire supplémentaire: le gène *vpx* (371) (Figure 3B). Des études ont montré que le SIVmnd2 peut se répliquer dans les PBMC humains *in vitro* (178). Ces observations montrent que le SIVmnd2 possède les capacités intrinsèques nécessaires à une transmission de mandrill à homme.

Des cas de transmission de rétrovirus du mandrill à l'homme ont déjà été décrits. En effet, le STLV-1 (simian T-cell lymphotropic virus) du *M. sphinx* a été décrit comme étant l'homologue simien du HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus) sous-type D (244). Ce HTLV-1 sous-type D est retrouvé dans les populations pygmées qui partagent les mêmes territoires avec le *M. sphinx* au Cameroun et chez des non-pygmées au Gabon (244). Un autre rétrovirus de primate, le SFV (simian foamy virus), est retrouvé chez les personnes en contact réguliers avec les primates africains. Dans une étude réalisée chez des chasseurs camerounais ayant des contacts avec des primates africains à travers la chasse, le dépeçage de la viande de brousse et/ou la possession d'un primate de compagnie, Wolfe et al. ont montré que trois de ces individus étaient porteurs d'un foamy virus dont l'un très proche du foamy virus du mandrill (SFVmsp) (432). Ces données mettent en évidence des transmissions inter-espèces du singe à l'homme de virus pouvant conduire comme les HIV-1 et 2 à de nouvelles pandémies. De plus, Souquière et al. ont décrit en 2001 le cas d'un patient camerounais présentant une sérologie HIV atypique (371). L'analyse de son sérum par des tests sérologiques basés sur les peptides de la boucle V3 a montré qu'il réagissait spécifiquement au peptide V3 SIVmnd suggérant une éventuelle transmission du SIVmnd à ce patient (371). S'il s'agit effectivement d'une transmission de SIVmnd du mandrill à l'homme, l'infection n'a probablement pas évolué vers une immunodéficience, mais souligne le risque de transmission de lentivirus autres que le SIVcpz et le SIVsmm aux populations vivant au contact des primates infectés. La forte prévalence de l'infection à SIV chez le mandrill augmente le degré d'exposition aux virus. A cela il faut ajouter les contacts réguliers à travers la chasse et la préparation de la viande de brousse, les mandrills étant couramment chassés et consommés en Afrique subsaharienne (209).

Il apparaît ainsi évident que le risque de transmission d'un SIV du mandrill à l'homme est réel et nécessite une vigilance particulière. Pour cette raison, il est indispensable d'approfondir nos connaissances sur la prévalence, la diversité et l'évolution de ces virus dans

la nature. Le but de ce travail était d'étudier la diversité génétique du SIVmnd2 chez les mandrills vivant au Cameroun, où ils sont chassés pour la consommation et le commerce de la viande de brousse.

II. Matériel et Méthodes

Echantillonnage et analyses sérologiques. Lors d'une récente évaluation sérologique, nous avons testé 27 échantillons de mandrills appartenant à l'espèce *M. sphinx* (5). Tous les échantillons avaient été collectés au Cameroun entre 1998 et 2002 soit sur de la viande de brousse destinée aux marchés camerounais, soit chez des mandrills hébergés dans des domiciles comme animaux de compagnie, principalement autour et dans la capitale camerounaise, Yaoundé. Pour la viande de brousse, le sang total était collecté par ponction cardiaque 12 à 72 h après la mort de l'animal et pour les animaux de compagnie par ponction dans une veine après administration d'un tranquillisant (la kétamine) à l'animal. Cette étude était menée en accord avec le Ministère Camerounais de l'Environnement, de la Forêt et de la Faune. Tous ces échantillons avaient été précédemment analysés par un test sérologique de confirmation HIV-1/2, l'INNO-LIA HIV confirmation (Innogenetics, Gent, Belgique), puis plus récemment par des ELISA SIVmnd2 utilisant des peptides de la boucle V3 et des protéines recombinantes de l'ectodomaine de la gp41 (5). Tous les échantillons présentant un résultat positif ou indéterminé à l'un des tests sérologiques étaient ultérieurement confirmés par PCR et analyses de séquences.

Analyses PCR et caractérisation partielle des SIVmnd2. L'ADN total était extrait du sang total ou des PBMC avec un kit d'extraction commercialisé par Qiagen (QIAGEN, Courtaboeuf, France), en se référant aux instructions du fabricant. Des PCR de confirmation étaient effectuées sur les échantillons positifs ou indéterminés en sérologie. Une PCR amplifiant un fragment *pol* de 650 pb était réalisée avec des oligonucléotides très sensibles et universels pour l'identification des SIV: NDR1/PolOR en 1^{er} *round* et Polis4/Uni2 en 2nd *round* en suivant le protocole précédemment décrit (97). Une seconde PCR universelle dans *pol*, précédemment décrite par Clewley et al. (83), utilisant les amorces DR1 (5'-TRCAYACAGGRGCWGAYGA-3')/DR2 (AIADRTCATCCATRTAYTG) en 1^{er} *round* et DR4 (5'-GGIATWCCICAYCCDGCAGG-3')/DR5 (5'-GGIGAYCCYTTCCAYCCYTGHGG-3') en 2nd *round* était réalisée sur les échantillons négatifs à la première PCR. Pour les échantillons négatifs aux deux PCR *pol*, la qualité du matériel génétique était vérifiée en amplifiant un fragment du gène de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) d'environ 1150 pb, avec les amorces GPD-F1 (5'-CATTACCAGCTCCATGACCAGGAC-3') et GPD-R1 (5'-GTGTTCCCAGGTGACCCTCTGGC-3') en un seul *round* de PCR. Ce gène localisé sur

chromosome X des mammifères, peut être facilement amplifié si le matériel génétique n'est pas dégradé (419). Les échantillons confirmés positifs par PCR étaient ensuite caractérisés sur des fragments génomiques de plus grande taille dans les régions *pol* (fragment A) et *env* (fragment B) (Figure 31 et Tableau 11). L'amplification des grands fragments *pol* était réalisée avec les oligonucléotides universels NDR1/PolOR en 1^{er} round et DR3/Uni2 en 2nd round pour un produit final de 2200 pb. Dans la région *env*, nous avons développé des oligonucléotides spécifiques aux SIVmnd-1 et 2 pour l'amplification d'un fragment de 2000 pb ENM.F1/ENM.R1 en 1^{er} round et ENM.F0/ENM.R2 en 2nd round (Figure 31 et Tableau 11).

Tableau 11. Amorces utilisées pour l'amplification des génomes partiels et complets de SIVmnd2

Types d'amorces et round PCR	Fragment*	Amorces	Région	Taille (kb)	Séquence des amorces
1		NDR1 PolOR	<i>pol</i>	2,7	TRGAYACAGGRGCWGAYGA ACBACYGCNCCTTCHCCTTTC
2	A	DR3 Uni2	<i>pol</i>	2,2	TAAACARTGGCCNYTNTCNAAAGAAAAAT CCCCTATTCCTCCCCTTCTTTAAAA
1		ENM.F1 ENM.R1	<i>Env/nef</i>	2,35	CAATGGGTRACAGTGTAYTATG CYTGSAGRTTCTTCAGCCAAAT
2	B	ENM.F0 ENM.R2	<i>Env/nef</i>	1,96	TGGGGAGCWATYTCYCYATGATAGAT AAGACATAAGGAAGAGGGCGATA
1		MND.02 MND.05	<i>pol</i> → <i>env</i>	2,66	GCAAGTGGGTATCTAGAAGCAGAAGTAAT AARTCATCATAATCATGTTTAGITCCATT
2	C	MND.01 MND.03	<i>pol</i> → <i>env</i>	2,33	CAAAGTCAAGGGGTAGTAGAAGCAAA CTCAACARTACATAYCCYGGSGGCACATA
1		MND.09 MND.07	<i>Env</i> → <i>gag</i> → <i>pol</i>	4,0	AGGARTATGTAGCGGACCAATCAAGAC ATCCCTAACTGCACCTCAAGAAATC
2	D ^b	MND.08 MND.06	<i>Env</i> → <i>gag</i> → <i>pol</i>	3,7	CAGAGGGCATATGAATTGGAACARAGAAAT TTGCCTTCTTYYTCCATTTCTTCACATA

^a Voir Fig. 31 pour les détails sur les stratégies d'amplification.
^b ADN circulaire non-intégré

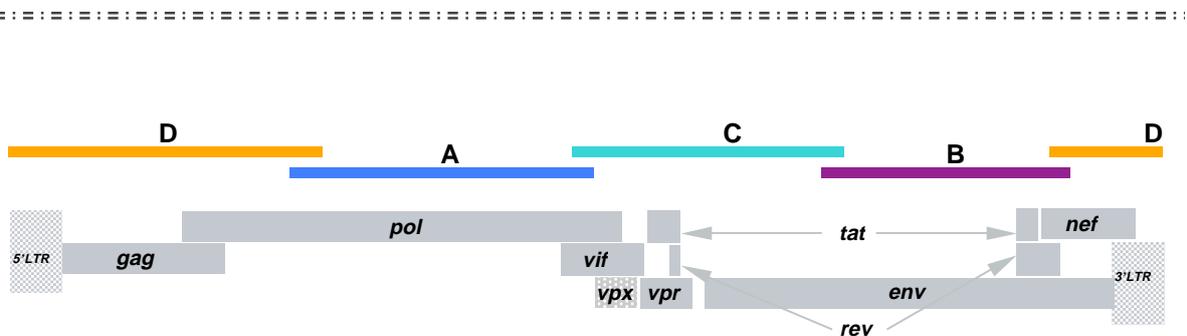


Figure 31. Stratégies d'amplification des régions Pol (A) et Env (B) ainsi que du génome complet du SIVmnd2.98CMS66. Les différents fragments (A, B, C, et D) ont été successivement amplifiés pour couvrir l'ensemble du génome avec les amorces universelles ou spécifiques décrites dans le Tableau 11.

Amplification du génome complet SIVmnd2. Les stratégies d'amplification du génome complet ont été facilitées par l'amplification antérieure des séquences *pol* et *env* de 2200 et 2000 pb respectivement. A partir des séquences de ces deux régions et de celles des génomes complets SIVmnd2 disponibles dans la GenBank SIVmnd14CG ([AF328295](#)) et SIVmnd5440 ([AY159322](#)), nous avons conçu des oligonucléotides spécifiques aux SIVmnd2 pour amplification du génome entier (Figure 31 et Tableau 11). Un fragment de 2333 pb a été amplifié avec les amorces MND.02/MND.05 en 1^{er} round et MND.01/MND.03 en 2nd round pour relier les fragments *pol* et *env* dans le sens *pol* 3' → 5' *env*. Ensuite, un second fragment de 3700 pb a été amplifié à partir de l'ADN circulaire non intégré avec les amorces MND.09/MND.07 en 1^{er} round et MND.08/MND.06 en 2nd round pour relier les deux fragments dans le sens *env* 3' → 5' *pol*, achevant ainsi l'amplification du génome complet (Figure 31 et Tableau 11). Pour toutes ces PCR, nous avons utilisé l'enzyme Long Expand PCR kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) conformément aux instructions du fabricant. Environ 500 ng d'ADN génomique étaient utilisés pour le 1^{er} round de PCR et 5 µl du produit de ce 1^{er} round étaient utilisés comme matrice pour le second. Chaque réaction d'amplification incluait une dénaturation manuelle (92°C, 2 min), suivie de 30 cycles de dénaturation-hybridation-élongation. Les températures d'hybridation étaient de 50°C et le temps d'élongation variait en fonction de la taille du fragment à amplifier, soit en général 1 min/1,5 kb. Les produits d'amplification étaient purifiés sur gel d'agarose et séquencés par la méthode de terminateur de chaîne marquée avec le kit Big Dye Terminator v3.1, selon les instructions du fabricant (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les séquences étaient générées par un séquenceur automatique à 16 capillaires (ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA). La vérification et l'assemblage des séquences en génome complet étaient effectués avec le logiciel SeqMan II (DNASTAR, Madison, WI).

Analyses des séquences. Les séquences protéiques des différents isolats ont été déduites par assemblage des produits des gènes *gag*, *pol*, *vif*, *env* et *nef*, après exclusion des extrémités carboxyle *gag*, *pol*, et *env* chevauchant *pol*, *vif* et *nef* respectivement. Les séquences nucléotidiques et/ou protéiques obtenues ont été alignées avec Clustal X (392), contre diverses séquences SIV déjà publiées et disponibles dans les bases de données de Los Alamos et de la GenBank; SIVmnd5440 ([AY159322](#)), SIVmnd14CG ([AF328295](#)), SIVdr1FAO ([AY159321](#)), SIVrcmGAB1 ([AF382829](#)), SIVrcmNgm ([AF349680](#)),

SIVmnd.GB1 (**M27470**), SIVlho (**AF075269**) et SIVsun (**AF131870**). Des courbes de diversité des séquences protéiques ont été réalisées sur les génomes complets avec le programme Simplot v2.5 (234), en assignant une fenêtre de 300 acides aminés (aa) et un pas de 20 aa. Les arbres phylogénétiques partiels Pol et Env ont été réalisés sur les séquences d'acides aminés par la méthode de maximum de vraisemblance avec le programme MrBayes basé sur la probabilité de distribution postérieure des arbres (179), les paramètres étant définis par le model d'évolution des protéines de Jones, Taylor et Thornton avec une distribution gamma affectée aux sites (195, 442), un nombre de générations égal à 500 000 et un "burnin" de 50 000 générations. La comparaison des séquences V3 et gp41 de l'enveloppe a été effectuée avec le programme SeqPublish (<http://www.hiv.lanl.gov/>).

III. Résultats

Analyses sérologiques. Au total 27 échantillons de mandrills ont été testés pour la présence d'anticorps anti-SIV, tout d'abord par réactions croisées avec les antigènes HIV-1 et HIV-2 du test de confirmation INNO-LIA et ensuite avec des ELISA spécifiques aux SIV parmi lesquels un peptide SIVmnd2.V3 et une protéine recombinante SIVmnd2.rgp41. Nous avons identifié 15 échantillons réagissant en INNO-LIA pour la plupart fortement avec la gp36 HIV-2 (88%) (Tableau 12). Parmi les 15 échantillons positifs à l'INNO-LIA HIV, 12 ont réagi au peptide Mnd2.V3 et 13 à l'ELISA Mnd2.rgp41. Un échantillon négatif à tous les antigènes HIV-1/2 était positif aux peptides et protéines Mnd2, l'échantillon S66. En résumé, 12 échantillons de mandrills ont été identifiés positifs au test HIV (INNO-LIA) et aux deux ELISA SIVmnd2; 2 échantillons ont été identifiés positifs uniquement à l'INNO-LIA; 1 échantillon a réagi uniquement à l'INNO-LIA et à l'ELISA rgp41 SIVmnd2 et 1 autre a réagi uniquement avec les ELISA SIVmnd2. Afin de confirmer la présence d'un SIV dans ces échantillons réagissant avec un ou plusieurs tests sérologiques, nous avons effectué des amplifications de séquences partielles par PCR.

Analyses PCR et caractérisation des SIVmnd2. Seize échantillons positifs à un ou plusieurs tests sérologiques ont été analysés par PCR. Un fragment de 650 pb a été amplifié dans la région *pol* avec les amorces NDR1-PolOR en 1^{er} round et PolIS4-Uni2 en 2nd round pour 9 échantillons, parmi lesquels celui positif uniquement aux ELISA SIVmnd2 (Tableau 12). Parmi les 7 échantillons négatifs à la première PCR, 1 a été amplifié sur un fragment *pol* de 192 pb avec les amorces DR1-DR2 en 1^{er} round et DR4-DR5 en 2nd round, 2 échantillons sont restés négatifs aux deux PCR et des analyses complémentaires ont montré que l'ADN était dégradé pour les quatre échantillons restants. Ainsi, l'infection à SIV a été confirmée pour 10 des 16 échantillons. D'autre part, à l'exception des échantillons dégradés, cette infection a été confirmée par PCR dans tous les échantillons positifs aux ELISA SIVmnd2 et pas dans les échantillons uniquement positifs au test HIV (INNO-LIA) (Tableau 12). Les analyses de phylogénie ont montré que toutes les séquences nouvellement amplifiées appartenaient au SIVmnd2 et provenaient d'individus non liés (données non présentées).

Afin d'étudier plus en détail la phylogénie des nouveaux SIVmnd2, nous les avons caractérisés sur des fragments de plus grande taille, de l'ordre de 2000 pb dans les régions *pol* (RT-intégrase) et *env* (V3-gp41). Ces amplifications ont été réalisées avec des amorces

Tableau 12. Résultats des analyses sérologiques INNO-LIA et différentes PCR réalisées sur le panel des échantillons de mandrills.

Identité	INNO-LIA								ELISA		PCR G6PDH	PCR pol			PCR env
	gp120	gp41	p31	p24	p17	gp36	gp105	Séro-LIA	Mnd2.V3	Mnd2.rgp41		NDR1 – PolIOR PolISA – Uni2 650 pb	DR1 – DR2 DR4 – DR5 192 pb	NDR1 – PolIOR DR3 – Uni2 2198 pb	
ML3	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
ML4	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
S111	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
S129	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
S130	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
S137	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
S76	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
S79	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
90	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
S1	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
S66	-	-	-	-	-	-	-	Neg	POS	POS	nt	nt	+	+	
94	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	nt	nt	nt	nt	
B116 (+)	-	-	-	-	(+)	-	-	POS	Neg	Neg	-	nt	nt	nt	
54	-	(+)	-	+	-	++	-	POS	POS	POS	nt	+	+	+	
55	-	-	-	-	+	-	-	Neg	Neg	Neg	+	-	nt	nt	
108	-	-	-	++	(+)	++	-	POS	POS	POS	+	-	nt	nt	
8021	-	(tr)	(tr)	(tr)	(tr)	2+	2+	POS	POS	POS	+	+	-	-	
8084	-	-	-	(+/-)	-	3+	-	POS	POS	POS	nt	nt	+	+	
8207	-	-	-	+/-	+/-	3+	(tr)	POS	POS	POS	nt	nt	-	-	
B111 (+)	-	-	-	+	+	+	-	POS	POS	POS	nt	nt	-	-	
S100	-	(+)	(+)	+	-	+	-	POS	POS	POS	nt	nt	+	+	
S109	-	(+)	-	(+)	-	+++	-	POS	POS	POS	nt	nt	+	+	
S46	-	-	-	++	-	++	-	POS	POS	POS	nt	nt	+	+	
S6	-	-	-	-	+	++	-	POS	POS	POS	nt	nt	+	+	
S8031	-	-	-	-	3+	3+	3+	POS	POS	POS	-	-	nt	nt	
S8231	-	-	-	-	3+	3+	-	Neg	POS	POS	-	-	nt	nt	
S8266	-	-	-	-	2+	2+	-	POS	POS	POS	-	-	nt	nt	

(tr) : trace

(+) : faiblement positif

nt: non testé

n₍₁₋₃₎ + : forte réactivité avec un maximum de n=3 pour les plus fortes réactivités.

universelles dans *pol* (NDR1-PolOR en 1^{er} round et DR3-Uni2 en 2nd round) et des amorces spécifiques aux SIVmnd ont été utilisées dans l'enveloppe (ENM.F1-ENM.R1 en 1^{er} round et ENM.F0-ENM.R2 en 2nd round) (Figure 31 et Tableau 11). Parmi les 10 échantillons confirmés positifs par PCR, 7 ont pu être amplifiés dans *pol* (2198 pb) et *env* (1960 pb) (SIVmnd2.98CM54, SIVmnd2.98CMS66, SIVmnd2.02CM8084, SIVmnd2.98CMS100, SIVmnd2.98CMS109, SIVmnd2.98CMS46 et SIVmnd2.98CMS6) et les 3 restants n'ont pu l'être ni dans *pol*, ni dans *env*, probablement pour des raisons de qualité de matériel biologique (ADN/ARN) ou des charges virales trop faibles (voir Tableau 12).

Analyses phylogénétiques des séquences partielles SIVmnd2 dans Pol et Env. Les séquences protéiques correspondants aux régions partielles Pol et Env des SIVmnd2 caractérisés ont été alignées avec des séquences SIV documentées comme étant proches du SIVmnd2 dans Pol (SIVdrl et SIVrcm) et dans Env (SIVdrl et virus de la lignée SIVlho/sun/mnd1). Des arbres phylogénétiques de 730 aa et 560 aa ont ainsi été estimés respectivement dans Pol et Env par la méthode Bayésienne en appliquant le model d'évolution des protéines de Jones, Taylor et Thornton (195) (Figure 32).

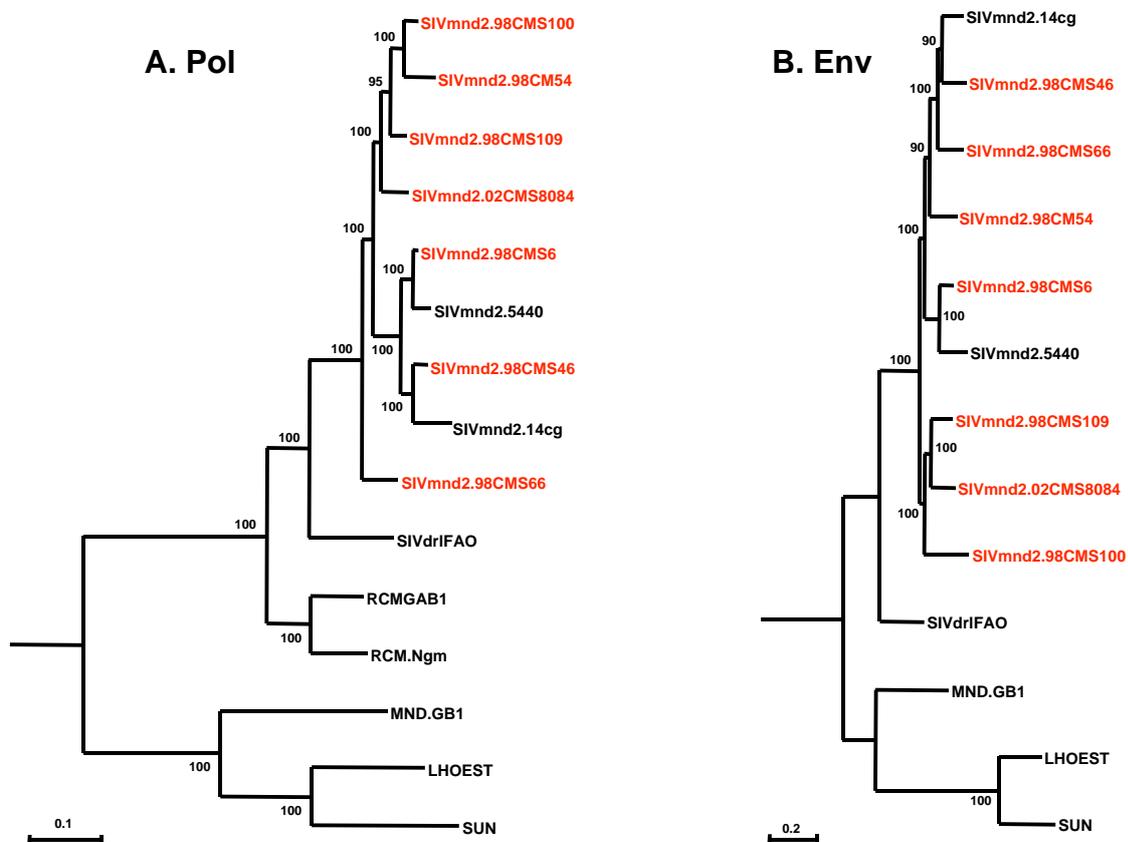


Figure 32. Arbres phylogénétiques des SIVmnd2 identifiés dans Pol et Env. Les arbres ont été estimés en maximum de vraisemblance sur les alignements partiels des protéines Pol (730 aa) et Env (560 aa) en appliquant le model d'évolution des protéines de Jones, Taylor et Thornton (Jones et al. 1992). Les chiffres sur les noeuds représentent les probabilités postérieures estimées. Les nouvelles souches SIVmnd2 identifiées sont représentées en rouge.

Dans la région Pol, les séquences SIVmnd2 formaient une lignée distincte avec les virus SIVdrl du drill et SIVrcm du cercocèbe à collier blanc (Figure 32A). Par contre dans la région Env, les séquences SIVmnd2 se groupaient toujours avec le SIVdrl, mais aussi avec les virus de la lignée SIVlho/sun/mnd1 (Figure 32B). Ces résultats correspondent à ceux précédemment décrits sur la phylogénie des SIVmnd2 (178, 371, 388), à savoir: (i) SIVmnd2 et SIVdrl sont très proches l'un de l'autre sur la totalité de leur génome et (ii) le SIVmnd2 est un virus mosaïque qui est proche du SIVrcm dans la région Gag-Pol et des virus de la lignée SIVlho/sun/mnd1 dans Env. Aucun profil phylogénique suggérant un lien épidémiologique entre les différents individus dont les séquences ont été analysées n'a été observé, prouvant que les nouveaux virus ne provenaient pas d'une ou plusieurs colonies de mandrills infectés par un ou plusieurs virus identiques. Dans Env, toutes les séquences SIVmnd2 formaient un groupe monophylétique, certaines étant plus proches des unes que des autres donnant ainsi l'impression de sous-groupes (Figure 32B). Par contre, dans Pol une séquence semblait plus divergente et se branchait entre le SIVdrl et les SIVmnd2: le SIVmnd2.98CMS66 (Figure 32A). Pour évaluer la diversité des nouveaux variants SIVmnd2 entre eux et par rapport à d'autres SIV, nous avons calculé et comparé les distances génétiques des différents isolats et groupes de virus, SIVmnd2, SIVdrl, SIVrcm, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun.

Etude des régions conservées de l'enveloppe chez les SIVmnd2: la boucle V3 et la région immunodominante de la gp41. Des peptides de la boucle V3 de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et de la région immunodominante de la gp41 sont utilisées comme antigènes dans le développement des outils de diagnostic des infections HIV et SIV respectivement chez l'homme et chez les primates non-humains (5, 254, 279, 367). Dans cette étude, nous avons analysé les séquences de la boucle V3 et de la région immunodominante de la gp41 des 7 SIVmnd2 caractérisés dans l'enveloppe (voir Tableau 12) en les comparant entre elles et avec celles des autres SIV (Figure 33 & 34). La comparaison des séquences de la boucle V3 a montré un extraordinaire degré de conservation de cette région chez les SIVmnd2, mais aussi entre SIVmnd2, SIVdrl, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun. Cette conservation entre les séquences V3 allait de 90 % entre les séquences SIVmnd2 et SIVmnd1 à 60% entre les séquences SIVmnd2 et les séquences SIVlho/sun (Figure 33). Par contre, seuls quelques résidus d'acide aminé étaient conservés entre les séquences V3 des SIVmnd2 et celles des HIV-1/SIVcpz, malgré la rigoureuse conservation des cystéines en position 296 et 331 (position déterminée par rapport au HIV1B.HXB2) responsables du pont disulfure de la boucle V3 (Figure 33).

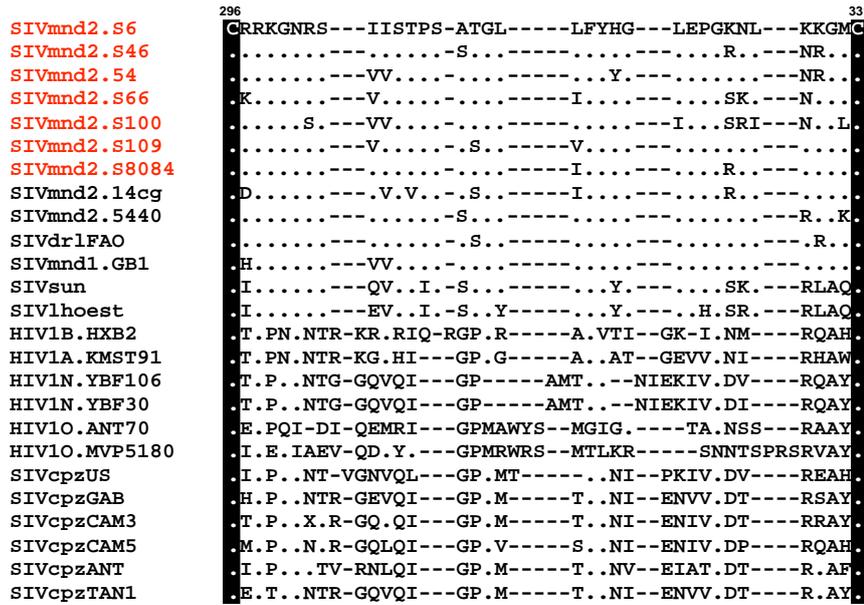


Figure 33. Alignement des séquences de la boucle V3. Les séquences V3 des SIVmnd2 sont alignées avec celles des SIV proches dans l'enveloppe (SIVdr1, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun), celles des SIVcpzPtt et SIVcpzPts et celles des HIV1M, N et O. Les SIVmnd2 nouvellement identifiés sont représentés en rouge. Les cystéines conservées en position 296 et 331 (par rapport au HIV1B.HXB2) sont indiquées sur fond noir. Les pointilles représentent les résidus identiques et les tirets sont introduits pour optimiser l'alignement.

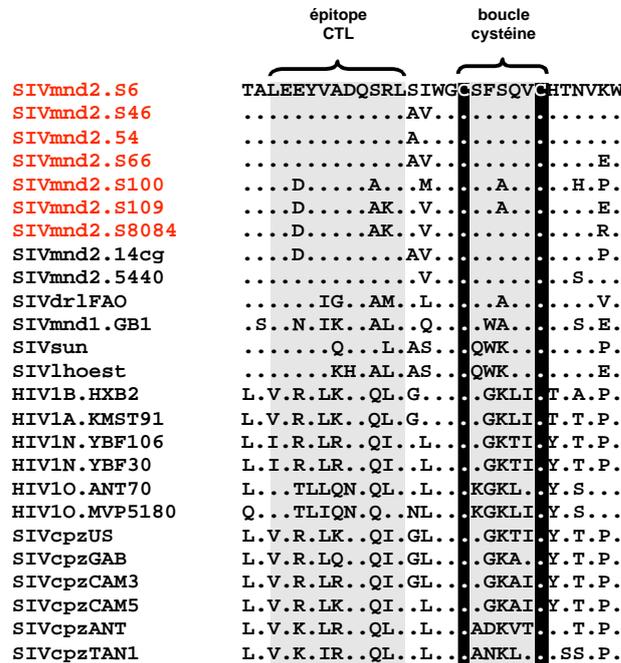


Figure 34. Alignement des séquences de la région immunodominante (IDR) de la gp41. Les séquences gp41.IDR des SIVmnd2 sont alignées avec celles des SIV proches dans l'enveloppe (SIVdr1, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun), celles des SIVcpzPtt et SIVcpzPts et celles des HIV1M, N et O. Les SIVmnd2 nouvellement identifiés sont représentés en rouge. L'épitope CTL et la boucle cystéine sont indiqués. Les cystéines conservées de la boucle Cys(X)5-7Cys sont représentées sur fond noir. Les pointillés représentent les résidus d'acides aminés identiques.

Dans la région immunodominante de la gp41, les séquences SIVmnd2 étaient très conservées, particulièrement au niveau de l'épitope CTL et de la boucle cystéine (Figure 34). La similitude avec les séquences SIVdrl, SIVlho et SIVsun était légèrement moins importante que celle observée dans la région V3. Curieusement, malgré la similitude phylogénétique entre SIVmnd1 et SIVmnd2 dans Env, la divergence entre les séquences ID gp41 mnd1 et mnd2 était très importante comparée à celle observée entre les séquences ID gp41 mnd2 et drl/lho/sun. Enfin, plus de 35% des résidus des séquences ID gp41 mnd2 étaient conservés dans les séquences HIV-1/SIVcpz (Figure 34). Ainsi, contrairement à ce observé dans la boucle V3, la similitude entre les séquences immunodominantes de la gp41 était moins spécifique à la lignée virale. Les résidus cystéine de la boucle cystéine étaient rigoureusement conservés pour toutes les souches SIV et HIV analysées.

Amplification du génome complet du SIVmnd2.98CMS66. L'origine et l'évolution des SIV infectant les mandrills restent assez complexes et aucune hypothèse n'est unanimement acceptée à ce jour. Les habitats des drills et mandrills sont séparés par la rivière Sanaga au Cameroun et cependant des virus SIVdrl-like ont été décrits chez des mandrills (178, 405). Nous n'avons identifié aucun virus SIVdrl parmi les séquences Pol et Env caractérisées dans cette étude. Cependant, un des échantillons, le SIVmnd2.98CMS66 semblait intermédiaire entre SIVmnd2 et SIVdrl dans la région Pol comparé aux autres séquences (Figure 32A). Dans la mesure où des SIVdrl-like ont été décrits chez des mandrills, il n'était pas impossible que le SIVmnd2.98CMS66 soit un recombinant SIVdrl-SIVmnd2, proche du SIVdrl dans la partie 5' de son génome et du SIVmnd2 dans la région 3'. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons caractérisé le SIVmnd2.98CMS66 sur la totalité de son génome. Ayant déjà amplifié cet échantillon sur 2200 pb et 2000 pb respectivement dans *pol* (fragment A) et *env* (fragment B), nous avons conçu des amorces spécifiques permettant l'amplification des régions restantes (Figure 31 et Tableau 11). Ainsi, nous avons utilisé les amorces MND.02-MND.05 en 1^{er} round et MND.01-MND.03 en 2nd round pour amplifier le fragment C de 2300 pb permettant de relier *pol* (fragment A) et *env* (fragment B) dans le sens *pol* 3' → 5' *env*. Pour terminer, nous avons amplifié l'ADN circulaire non intégré avec les amorces MND.09-MND.07 en 1^{er} round et MND.08-MND.06 en 2nd round pour amplifier le fragment D de 3700 pb couvrant la région *env* 3' → *gag* → 5'*pol*. Les fragments amplifiés ont été purifiés, directement séquencés et assemblés avec le logiciel SeqManII pour obtenir des séquences contiguës. Cette stratégie a permis d'amplifier le génome complet du SIVmnd2.98CMS66 sur 9611 pb. L'organisation génomique du SIVmnd2.98CMS66 était

similaire à celle des virus de la lignée SIVsmm/HIV-2, SIVrcm et SIVmnd2, c'est-à-dire 3 fenêtres de lecture pour les principaux gènes *gag*, *pol* et *env*; 5 fenêtres de lecture pour les gènes accessoires *vif*, *vpr*, *tat*, *rev* et *nef*; et 1 fenêtre de lecture pour le gène accessoire *vpx*. Des courbes de diversité ont été réalisées pour étudier la phylogénie du SIVmnd2.98CMS66 et rechercher d'éventuelles recombinaisons entre SIVmnd2 et SIVdrl.

Courbes de diversité. Les courbes de similitude ont été réalisées à partir des séquences protéiques incluant des séquences complètes de SIVmnd2 publiées (SIVmnd2.14cg et SIVmnd2.5440), ainsi que les génomes complets SIVdrl, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun. La séquence du SIVcolCGU1 du colobe guéréza a été inclus comme *out-group* (Figure 35). Sur ces courbes, la différence entre les séquences était représentée sur l'axe y (axe vertical) et les points correspondant à la région de la séquence représentés sur l'axe x (axe horizontal). De ce fait, plus l'écart observé entre les courbes était faible, plus la similitude entre les séquences comparées était importante. Sur la Figure 35, nous avons comparé la séquence du SIVmnd2.98CMS66 aux séquences de référence. La séquence SIVmnd2.98CMS66 était plus proche des autres séquences SIVmnd2 (SIVmnd2.5440 et SIVmnd2.14cg) sur la totalité de son génome et aucune évidence de recombinaisons entre SIVmnd2 et SIVdrl n'a été observée.

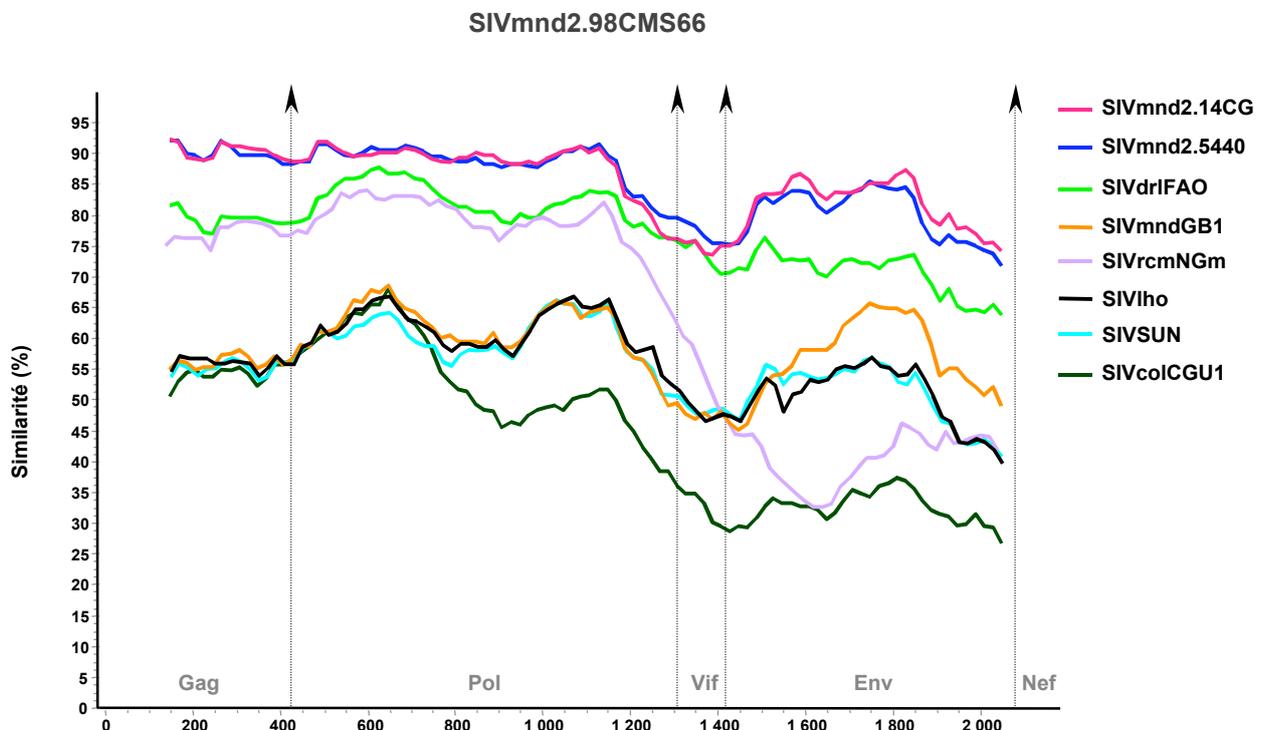


Figure 35. Courbe de diversité des séquences protéiques concaténées illustrant le degré de similitude génétique entre SIVmnd2.98CMS66 et d'autres SIV. La proportion des différences de séquence d'acide aminé entre le SIV étudié et les autres SIV est représentée par différentes couleurs. Les valeurs de ces différences sont tracées dans des fenêtres de 300 aa, avec un pas de 20 aa par déplacement sur l'axe x. La similarité entre les protéines virales est indiquée sur l'axe y (en %).

Diversité génétique des SIVmnd2 et relation avec d'autres SIV. Nous avons calculé les distances intra et inter-espèces entre SIVmnd2, SIVdrl, SIVrcm, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun. La distance intra-espèces (entre souches SIV de la même espèce) étaient représentées par les lettres A, B, C, D, E et F respectivement pour SIVmnd2, SIVdrl, SIVrcm, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun. Ces distances génétiques intra-espèces n'ont pu être déterminées pour SIVdrl, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun par manque de séquences disponibles dans les régions étudiées. La plupart des séquences partielles SIVdrl et SIVmnd1 publiées ayant été soit isolées de colonies de primates, soit caractérisées sur de trop courts fragments (371). Les distances inter-espèces ont été calculées entre SIVmnd2 et SIVdrl (A vs B), entre SIVdrl et SIVrcm (B vs C)... pour déterminer la distance entre virus d'espèces différentes (Tableau 13).

Tableau 13. Divergence intra et inter-espèces entre SIVmnd2, SIVdrl, SIVrcm, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun. La divergence intra-espèces est représentée par les lettres A à F respectivement pour SIVmnd2, SIVdrl, SIVrcm, SIVmnd1, SIVlho et SIVsun. Cette divergence a été uniquement calculée pour SIVmnd2 et SIVrcm (A et C), les autres virus étant représentés par un seul génome complet et/ou des séquences de trop courte taille dans les régions Pol et Env. A vs B, A vs C, B vs C... représentent les divergences moyennes entre virus de différentes espèces.

	Pol	Env	
A : SIVmnd2. vs SIVmnd2	0,08	0,19	
B : SIVdrl			
C : SIVrcm.Ngm vs GAB1	0,14	0,24	
D : SIVmnd.GB1			Intra-espèces
E : SIVlho			
F : SIVsun			
<hr/>			
A vs B : mnd2 vs drl	0,20	0,36	
A vs C : mnd2 vs rcm	0,24	1,24	
A vs D : mnd2 vs mnd1	0,50	0,51	
A vs E : mnd2 vs lho	0,52	0,72	
A vs F : mnd2 vs sun	0,55	0,73	
B vs C : drl vs rcm	0,23	1,24	
B vs D : drl vs mnd1	0,52	0,46	
B vs E : drl vs lho	0,53	0,66	
B vs F : drl vs sun	0,60	0,67	Inter-espèces
C vs D : rcm vs mnd1	0,51	1,28	
C vs E : rcm vs lho	0,51	1,39	
C vs F : rcm vs sun	0,58	1,39	
D vs E : mnd1 vs lho	0,38	0,62	
D vs F : mnd1 vs sun	0,39	0,70	
E vs F : lho vs sun	0,29	0,31	

Les distances génétiques intra-espèces ont montré une faible divergence entre les séquences SIVmnd2 dans Pol et Env, comparé par exemple aux séquences SIVrcm dans les mêmes régions. Comparativement au HIV-1, la distance entre SIVmnd2 correspondait à la distance entre sous-sous-types (A1/A2, ou F1/F2) (143, 396). Cette faible divergence a été observée pour toutes les séquences SIVmnd2, aussi bien celles identifiées au Cameroun par d'autres équipes, que celles caractérisées par Souquière et al. au Gabon (371, 384). L'infection à SIVmnd2 est donc largement distribuée chez les mandrills dans cette région de l'Afrique centrale. Cette infection est aussi caractérisée par l'absence de différenciation géographique entre souches circulant au sud de la rivière Sanaga au Cameroun et celles identifiées au nord de la rivière Ogooué au Gabon (Figure 36).

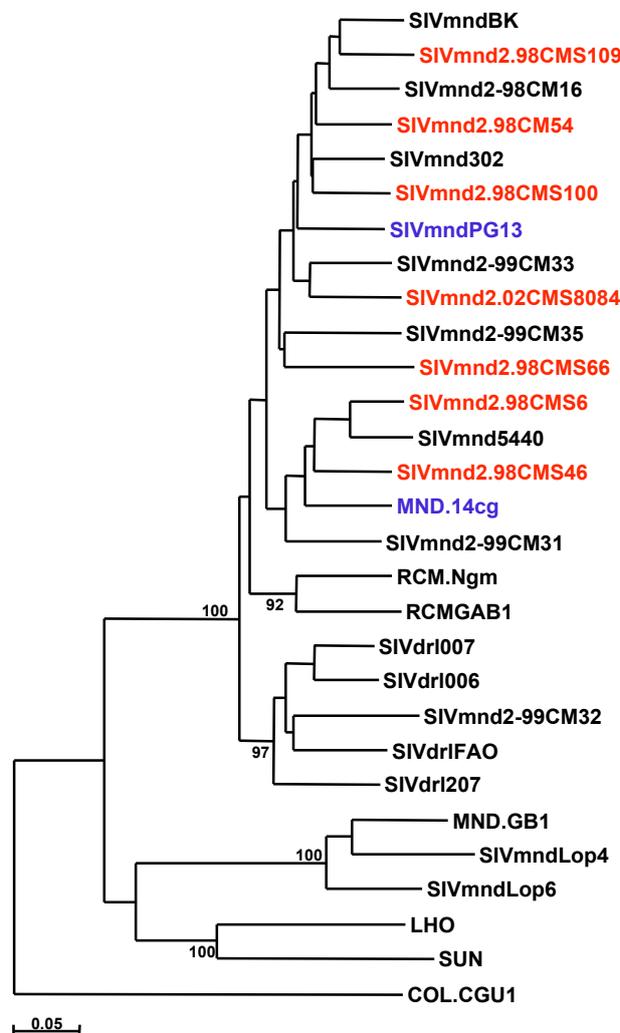


Figure 36. Arbre phylogénétique des séquences partielles *pol* incluant les souches SIVmnd2 caractérisées dans cette étude et d'autres souches SIVmnd et SIVdrl disponibles. Les souches que nous avons caractérisées au Cameroun sont représentées en rouge et celle caractérisée au Gabon par Souquière et al. en 2001 sont représentées en bleu. L'arbre a été estimé par la méthode du plus proche voisin (Saitou and Nei, 1987) sur un alignement de 344 acides nucléiques. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 90% ont été conservées.

La comparaison des distances inter-espèces a montré différents cas de figure (Tableau 13):

→ Premièrement, la divergence entre SIVmnd2, SIVdrl et SIVrcm était très faible dans Pol et reflétait la phylogénie de ces trois virus dans la partie 5' de leurs génomes (178). En effet, ayant acquis la partie Gag-Pol du SIVrcm à travers des recombinaisons, il est logique que SIVmnd2 et SIVdrl soient plus proche du SIVrcm dans cette région. D'autre part, nous avons observé la même distance entre ces trois virus dans la région Pol, preuve qu'ils n'ont pas eu le temps de diverger chez leurs hôtes respectifs (cercocèbes à collier blanc, mandrills et drills). La recombinaison SIVrcm/SIVmnd à l'origine des SIVmnd2 et SIVdrl serait donc un événement assez récent, de même que les transmissions inter-espèces aux cours desquelles les mandrills et le drills ont respectivement été infecté par les SIVmnd2 et SIVdrl.

→ Dans Env, SIVmnd2 et SIVdrl sont très divergents du SIVrcm, mais plus proches du SIVmnd1, virus retrouvé chez les mandrill au sud de la rivière Ogooué. Cette similitude entre SIVmnd1 et SIVmnd2 a été justifiée comme résultant de recombinaisons entre SIVmnd1 et SIVmnd2 à une époque où les territoires des mandrills infectés par les deux types de virus se chevauchaient, mais reste à démontrer (371).

IV. Discussion

SIVmnd chez les mandrills vivant entre la rivière Sanaga au Cameroun et la rivière Ogooué au Gabon. Les mandrills (*Mandrillus sphinx*) sont des primates terrestres assez corpulents qui vivent dans la forêt tropicale, du sud de la rivière Sanaga au Cameroun à la rivière Congo au sud de la République Populaire du Congo (157). Deux lentivirus ont été identifiés chez le mandrill: le SIVmnd1 et le SIVmnd2, le premier chez les mandrills vivant au sud de l'Ogooué au Gabon et le second chez les mandrills vivant entre l'Ogooué et la Sanaga au Cameroun (371, 384, 400). L'identification récente de deux virus distincts chez le *C. cephus* (voir chapitre précédent), fait du moustac et du mandrill les seuls primates non-humains porteurs de plusieurs types de lentivirus. Des SIVmnd2 ont été partiellement caractérisés chez des mandrills vivant au Cameroun, mais uniquement chez des animaux de compagnie (384) et en captivité (371).

Dans cette étude, nous avons confirmé l'infection à SIVmnd2 chez les mandrills sauvages vivant au Cameroun, deux des échantillons positifs sur dix ayant été collectés sur des animaux sauvages (viandes de brousse). Aucun profil épidémiologique pouvant suggérer que les échantillons analysés provenaient d'individus liés, donc porteurs d'un même virus n'a été observé. Aucune évidence de recombinaison entre SIVmnd2 et SIVdrl n'a été observée dans nos échantillons, ni la présence de SIVdrl-like chez les mandrills testés malgré la caractérisation du génome complet d'un isolat dont la séquence partielle Pol se branchait entre SIVmnd2 et SIVdrl. Ces résultats sont en accord avec la distribution actuelle des populations de mandrills et drills, car leurs territoires ne se chevauchent pas et sont séparés par la rivière Sanaga au Cameroun (Figure 36). Cependant, deux études ont rapporté la présence de séquences SIVdrl-like chez les mandrills captifs provenant de cette région (178, 405). La séquence décrite par J. Takehisa et al. (SIVmnd2-99CM32) (384) et collecté chez un mandrill de compagnie au sud Cameroun, se groupait avec les séquences SIVdrl dans un arbre partiel *pol* (178). Les autres séquences SIVdrl-like (CAS et REB) rapportées par A. C. van der Kuyl et al. (405), provenaient de mandrills en captivité dans un zoo. Donc aucune de ces séquences SIVdrl-like n'a été décrite chez des mandrills sauvages. Sachant qu'il peut être très difficile de reconstituer l'histoire naturelle des primates en captivité et celle des animaux de compagnie, il n'est pas impossible que les séquences SIVdrl-like décrites à ce jour chez les mandrills soient des résultats de transmissions inter-espèces survenues en captivité.

Le calcul des distances génétiques a montré une faible divergence entre les souches SIVmnd2 dans Pol et Env, comparable à la distance entre sous-sous-types HIV-1. Cette faible distance génétique entre souches SIVmnd2 peut soit refléter le caractère récent de l'infection à SIVmnd2 chez les mandrills vivant entre les rivières Ogooué et Sanaga, soit une évolution plus lente des SIVmnd2 comparé aux HIV-1. Cependant, les prévalences à SIVmnd2 sont parmi les plus importantes (environ 50%) comparé à celles des autres lentivirus décrits chez les primates africains (5, 384). D'autre part, l'infection à SIVmnd2 semble être largement distribuée chez les mandrills vivant dans cette région et homogène car aucune différenciation géographique n'a été observée entre les souches SIVmnd2 caractérisées au Cameroun et celles caractérisées au Gabon.

Origine et évolution des SIVmnd2.

Il est démontré que les mandrills sont porteurs de deux virus distincts et que les populations infectées par chacun des deux virus sont géographiquement séparées (Figure 37). Les mandrills vivant au sud de la rivière Ogooué sont porteurs du SIVmnd1 qui dans un arbre phylogénétique se groupe avec les virus SIVlho et SIVsun. Cependant, SIVmnd1 se groupe avec SIVmnd2 et SIVdrl dans Env et l'hypothèse de transmissions intra-espèces entre mandrills du sud et du nord de la rivière Ogooué suivi de recombinaisons entre SIVmnd1 et SIVmnd2 a été émise pour justifier cette similitude

(371). Des transmissions inter-espèces entre cercopithèques à queue de soleil et mandrills du sud de la rivière Ogooué ont aussi été avancées comme étant à l'origine des SIVmnd1, les territoires des deux primates se chevauchant (371, 388, 391). Cependant, les divergences observées dans cette étude entre SIVmnd1, SIVmnd2/SIVdrl et SIVlho/sun, suggèrent d'autres hypothèses.

Le cercopithèque de l'Hoest et le cercopithèque à queue de soleil appartiennent à la super-espèce *lhoesti* et vivent sur des territoires distants de 1600 km (157). La proximité de leur virus suggèrent qu'ils sont porteur d'un virus commun acquis soit par transmissions inter-

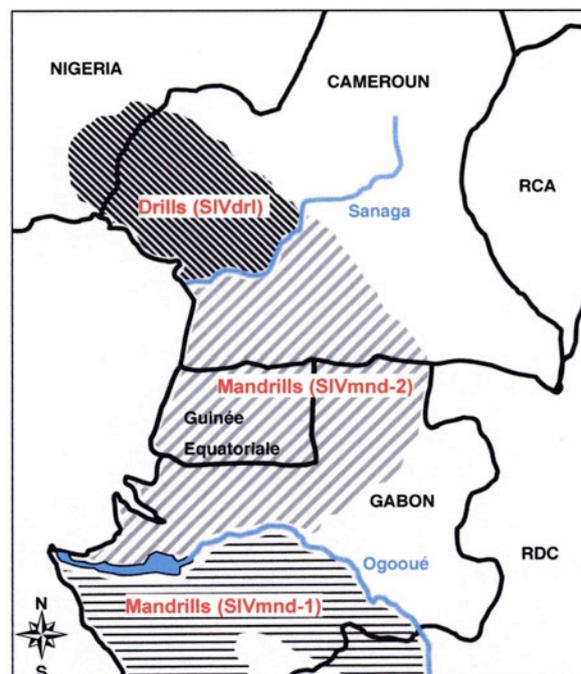


Figure 37. Distribution des drills (SIVdrl), mandrills infectés par SIVmnd2 et mandrills infectés par SIVmnd1 en Afrique centrale.

espèces, soit à travers un ancêtre commun avant leur différenciation et leur séparation géographique, probablement durant le dernier million d'années (45). Ces hypothèses sont supportées par l'identification récente d'un SIV proche des SIVlho/sun chez le cercopithèque de Preuss, dernière espèce de la super-espèce *lhoesti*, qui vit au nord de la rivière Sanaga au Cameroun (24). Le SIVsun a donc probablement évolué chez son hôte et divergé du SIVlho pendant la différenciation et la séparation géographique de son hôte des autres espèces de la super-espèce *lhoesti*. Donc, si le SIVmnd1 était le résultat de transmissions inter-espèce entre cercopithèques à queue de soleil et mandrills du sud de l'Ogooué, on s'attendrait à ce que le SIVsun soit plus proche du SIVmnd1 que du SIVlho, dans la mesure où cette transmission serait très récente comparée à l'émergence des virus de la super-espèce *lhoesti*. D'autre part ce décalage dans la chronologie des événements fait qu'on ne peut expliquer cette divergence entre SIVmnd1 et SIVlho/sun uniquement par une vitesse d'évolution plus rapide chez le mandrill. L'hypothèse la plus probable dans l'origine du SIVmnd1 est sûrement un ancêtre viral commun aux mandrills et aux primates de la super-espèce *lhoesti*, ce qui expliquerait la proximité des SIVmnd1, SIVlho et SIVsun sur la totalité de leurs génomes.

La similitude entre SIVmnd1 et SIVmnd2 dans Env a été justifiée par des transmissions intra-espèces entre mandrills du sud de l'Ogooué et ceux du nord suivies de recombinaisons (371), ce qui supposerait que, soit les mandrills étaient porteurs de deux types de virus avant leur séparation géographique et que des transmissions intra-espèces ont eu lieu avant cette séparation, soit que les deux populations sont entrées en contact après leur séparation. Aucune évidence ne permet actuellement de valider ces hypothèses, par contre une explication plus simple peut être avancée. Il est fort probable que tous les mandrills aient été initialement porteur d'un seul type de virus, le SIVmnd. Après la séparation des mandrills par la rivière Ogooué, les virus des deux populations ont subi des différenciations géographiques accentuées par les différenciations de leurs hôtes conduisant à la formation du SIVmnd1 au sud de l'Ogooué et du SIV précurseur du SIVmnd2 au nord, ce virus précurseur au nord de l'Ogooué étant à l'origine du SIVmnd2 par recombinaison avec le SIVrcm. En effet, P. T. Telfer et al. ont récemment démontré que les mandrills vivant des deux côtés de la rivière Ogooué représentaient deux haplotypes différents à partir des séquences des cytochromes *b*, et cette divergence était corrélée à la distribution géographique actuelle des deux groupes de mandrills (391). Néanmoins, en l'absence de caractères phénotypiques distinctifs entre les deux populations, elles ne peuvent pas être considérées comme des sous-espèces, mais ce marqueur de différenciation (cytochrome *b*) prouve que les virus des mandrills peuvent avoir divergé avec leurs hôtes des deux côtés de l'Ogooué, ce qui expliquerait qu'ils soient proches

dans Env, mais restent assez divergents comparé aux SIVmnd2/SIVdrl ou SIVlho/SIVsun par exemple.

Le second virus mandrill, SIVmnd2, est très proche du virus isolé chez le drill, l'espèce la plus proche du mandrill. Les drills sont considérés naturellement porteurs du SIVdrl bien que toutes les séquences décrites à ce jour proviennent d'animaux en captivité dans des réserves ou des centres de primatologie. Il semble donc nécessaire de confirmer réellement l'infection à SIVdrl chez des drills sauvages. Néanmoins, la forte prévalence de l'infection à SIVdrl chez le drill tend à confirmer sa présence naturelle chez ce primate (83). L'origine commune des SIVmnd2 et SIVdrl a été démontrée car les deux virus sont très proches l'un de l'autre sur la totalité du génome et ont la même organisation génomique (178). Ils sont tous deux recombinants, avec une région Gag-Pol proche du SIVrcm. Cependant, les calculs de distance réalisés dans cette étude ont montré une très faible divergence entre SIVmnd2, SIVdrl et SIVrcm. Les événements de recombinaison et de transmission inter-espèces à l'origine des SIVmnd2 et SIVdrl sont donc récents car on constate que ces deux virus n'ont pas encore évolué chez leur hôtes respectifs et divergé du SIVrcm d'une part et entre eux d'autre part. Mandrills et drills sont séparés par la rivière Sanaga au Cameroun (Figure 37), la présence d'un même virus chez ces deux primates reste donc difficile à expliquer. Cependant, des divergences d'opinions sur la séparation réelle des territoires de mandrills et drills ont été rapportées (391) et pourraient expliquer d'éventuels contacts entre ces deux primates et des transmissions inter-espèces.

Risques de transmissions zoonotiques du SIVmnd2 du mandrill à l'homme. Les primates africains sont couramment chassés en Afrique subsaharienne et les mandrills sont pratiquement menacés d'extinction à cause de la chasse intensive (209). Ils représentent une importante source de protéines pour la population locale et le commerce de la viande de brousse est une source de revenu (29, 148). Dans une récente étude menée au Cameroun sur la diversité des SIV circulant chez les primates non-humains, nous avons montré qu'une importante proportion de viande de brousse de primates vendue sur les marchés camerounais, parmi lesquels des mandrills, était porteuse d'un SIV (304). Tous les échantillons testés dans cette étude ont été collectés sur des primates chassés et vendus sur les marchés camerounais ou utilisés comme animaux de compagnie. De précédentes études ont mis en évidence la présence de SIVmnd2 chez des mandrills hébergés comme animaux de compagnie au Cameroun (384). Autant d'observations qui montrent que les contacts entre les populations humaines et les mandrills infectés par un SIV sont très courants. On peut donc considérer que

des transmissions de SIVmnd2 du mandrill à l'homme sont possibles. Le SIVmnd2 possède la même organisation génomique que le SIVsmm du mangabey enfumé à l'origine du HIV-2 chez l'homme et peut infecter et se répliquer dans les PBMC humains *in vitro* (178).

Les outils de diagnostic des HIV-1 et HIV-2 utilisent les antigènes de ces virus et plus particulièrement les peptides synthétiques de la boucle V3 de la gp120 et des protéines de la gp41 (90). Dans une précédente étude, nous avons montré que les tests utilisant les antigènes HIV-1/HIV-2 n'étaient pas appropriés à l'identification des infections SIV (5). La diversité observée entre les séquences des régions conservées de l'enveloppe (V3 et gp41) des HIV et SIV explique en partie ce manque d'efficacité des tests HIV. Nous avons montré dans cette étude une importante variabilité entre les séquences V3 du SIVmnd2 et celles du HIV-1. Dans la gp41 cette divergence était légèrement moins importante, mais restait présente. Ces résultats montrent que les chances de croisement entre les antigènes HIV-1 et les anticorps anti-SIVmnd2 sont faibles d'où la nécessité d'élaborer des tests spécifiques pour rechercher les lentivirus simiens chez l'homme. L'utilisation d'un tel outil a permis à Souquière et al. d'identifier un patient camerounais HIV positif, réagissant fortement et spécifiquement à un peptide V3-SIVmnd1 (371). Bien qu'aucune séquence SIVmnd-like n'ait été amplifiée chez ce patient, la possibilité d'une infection par SIVmnd n'ayant pas abouti à une immunodéficience ne peut être exclue. Si de telles transmissions sont courantes, elles représentent une réelle menace car la forte diversité des souches HIV-1 et SIV circulant en Afrique Centrale peut favoriser l'émergence de virus recombinants HIV/SIV compétents, dotés de capacité de propagation chez l'homme.

En conclusion, nous avons confirmé la présence du SIVmnd2 chez les mandrills sauvages vivant au Cameroun. Nous avons également montré qu'un virus ancestral commun aux mandrills et aux primates de la super-espèce *lhoesti* est probablement à l'origine du SIVmnd1. De plus nos analyses ont montré que le SIVmnd1 et le virus mandrill à l'origine du SIVmnd2 ont un ancêtre commun et ont probablement divergé avec leur primates respectifs après leur séparation par la rivière Ogooué. Néanmoins, plusieurs interrogations restent sans réponses et nécessitent plus d'investigations. Il est nécessaire de confirmer l'infection à SIVdrl chez les drills sauvages au nord de la rivière Sanaga et sur l'île de Bioko. D'autres génomes complets de SIVmnd1 doivent également être caractériser pour mieux comprendre la phylogénie de ce virus, et enfin les primates dont les territoires chevauchent ceux des mandrills, drills et cercocèbes à collier blanc, tel que le cercopithèque de Preuss et le mangabey à joues grises, sont capables de fournir de précieuses informations sur l'origine et l'évolution des SIVmnd et SIVdrl. Il est donc indispensable d'identifier et caractériser les SIV

infectant ces espèces s'ils en sont porteurs. Des tests spécifiques à l'identification des lentivirus de primates chez l'homme sont également nécessaires pour rechercher des transmissions de lentivirus autres que le SIVcpz et le SIVsm du singe à l'homme.

V. Publications

Un article présentant les résultats de ce travail est en cours de rédaction.

CONCLUSION

Près de 5 millions de nouveaux cas d'infections par le HIV ont été enregistrés au cours de l'année 2005, soulignant l'ampleur de la pandémie et les difficultés à initier et appliquer des programmes de prévention efficaces (292). La recherche de thérapeutiques et de vaccins préventifs est l'une des principales voies de lutte contre l'infection à HIV, et nécessite une connaissance approfondie de la physiopathologie, de l'épidémiologie, de la diversité génétique et de l'évolution du HIV. Les nombreuses études menées à ce jour ont mis en évidence l'importante diversité génétique des HIV, particulièrement le HIV-1 dont le groupe M représente plus de 99% des souches circulant dans le monde. Le HIV-2 reste endémique en Afrique de l'ouest, avec de rares cas identifiés en Inde et dans quelques pays de l'Europe occidentale et de l'Asie de l'est. L'Afrique centrale et l'Afrique de l'ouest sont caractérisées par une importante diversité génétique des souches circulantes, avec de nombreuses formes recombinantes et CRFs. Cette forte diversité génétique du HIV limite l'élaboration des outils de diagnostic, des thérapeutiques efficaces et la mise au point d'un vaccin.

L'identification des souches HIV très divergentes (groupes O et N) a permis d'améliorer les outils de diagnostic sérologique pour l'identification correcte des personnes infectées. Cependant, ces outils doivent être encore améliorés, particulièrement pour leur utilisation en Afrique subsaharienne où diverses souches HIV-1 co-circulent, mais surtout où l'on obtient beaucoup de résultats indéterminés. Le diagnostic moléculaire reste marqué par le nombre limité de tests capables de déterminer la charge virale pour toutes les souches HIV-1 circulantes et l'absence de tests commercialisés pour les charges virales HIV-2.

D'importants progrès ont été réalisés dans le domaine de la thérapeutique antirétrovirale et se sont traduits par des changements cliniques majeurs, avec la réduction du nombre de décès et l'incidence des infections opportunistes (204). Aux trois classes d'antirétroviraux traditionnellement utilisés (INRT, INNRT, IP), s'est récemment ajoutée une quatrième, celle des inhibiteurs de fusion et d'entrée, à l'exemple du T20 (Enfuvirtide) dont l'efficacité est démontrée chez les patients multirésistants aux autres classes d'ARV (223). Les inhibiteurs d'intégrase représentent une cinquième classe, qui associée aux précédentes permettra de repousser davantage les limites liées à l'utilisation des ARV que sont les résistances acquises, la toxicité et les contraintes liées au traitement sur le très long terme. L'accès aux ARV représente une autre limitation au traitement, particulièrement dans les pays du Sud et souligne la nécessité, voire l'urgence de la mise au point d'un vaccin préventif accessible à tous.

Le développement d'un vaccin demeure un impératif de santé publique vu l'insuffisance actuelle des moyens de prévention et la flambée épidémiologique observée en

Afrique et en Asie. Cette recherche est limitée par l'importante diversité génétique des souches HIV et le manque de connaissances actuelles sur les mécanismes précis impliqués dans l'immunologie de l'infection à HIV. La voie classique de développement vaccinale basée sur le concept de la protection par les anticorps, particulièrement les protéines d'enveloppe (gp160/120) et les peptides de la boucle V3 s'est avérée insuffisante. De nouveaux concepts ont été mis au point (réponse CTL associée aux virus recombinants, vaccins ADN, modes/systèmes d'administration et amélioration des adjuvants) (126). Autant de progrès qui témoignent des avancées réalisées dans le développement des candidats vaccins, mais dont l'efficacité reste limitée.

Les études menées sur la diversité génétique, l'épidémiologie et la prise en charge de l'infection à HIV doivent être complétées par une meilleure compréhension de l'origine de ce virus. Depuis l'identification du premier homologue simien du HIV chez le macaque en 1984, des lentivirus simiens ont été caractérisés chez une trentaine de primates africains (50, 105). Les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier les virus simiens à l'origine des HIV-1 et HIV-2, respectivement le SIVcpz du chimpanzé et le SIVsmm de mangabey enfumé (140, 171). La caractérisation des lentivirus simiens a mis en évidence l'extraordinaire diversité génétique de ces virus chez leurs hôtes naturels que sont les primates africains et la complexité des relations phylogénétiques entre ces virus (161). Des anticorps anti-HIV et/ou SIV ont été identifiés chez plus de 36 espèces de ces primates et l'infection a été confirmée par amplification et analyse de séquences chez 30 espèces, majoritairement des petits singes de la famille des *Cercopithecidae* (50). Cependant, tous les lentivirus simiens sont loin d'avoir été identifiés car beaucoup d'espèces de primates n'ont pas encore été testées ou l'ont été sur un nombre réduit d'individus. L'origine et l'évolution de ces virus restent difficiles à déterminer et nécessitent de caractériser davantage de virus. Une meilleure compréhension de l'histoire naturelle des hôtes que sont les primates africains permettra également d'approfondir nos connaissances sur les SIV. L'origine simienne des HIV-1 et HIV-2 souligne aussi le risque que représentent pour l'homme les contacts réguliers avec les lentivirus simiens à travers la chasse, la consommation de viandes de brousse et la détention de primates domestiques en Afrique subsaharienne (161, 304). Rien ne permet à ce jour de penser que le SIVcpz et le SIVsmm sont les seuls lentivirus ayant la capacité de se transmettre à l'homme, d'où la nécessité de prévenir de nouveaux cas de transmissions de SIV. Pour ces raisons, il est indispensable d'étudier plus en détail la diversité, l'évolution et l'origine des

lentivirus simiens et de sensibiliser les populations africaines sur les risques que représentent les contacts avec les primates porteurs de lentivirus.

Les travaux de cette thèse ont couvert les volets humains et simiens de l'infection par les lentivirus de primates. Dans la partie HIV, nous avons montré l'extraordinaire diversité génétique des variants HIV-1 circulant au Cameroun et confirmé les résultats décrits par d'autres auteurs (3, 133, 257, 258, 278, 287, 288, 385). Nous avons aussi montré l'efficacité des tests sérologiques utilisés dans le diagnostic des infections à HIV dans ce pays, malgré une importante prévalence de résultats indéterminés (3). Nous avons mis en évidence les conséquences du polymorphisme naturel des souches non-B sur l'interprétation des algorithmes de résistance et montré l'absence de résistances primaires au seul inhibiteur de fusion actuellement commercialisé sur un important panel de souches non-B (4, 415). Les résultats de cette partie de thèse ont confirmé la forte diversité génétique des souches HIV-1 non-B au Cameroun et montré l'efficacité des outils de diagnostic sérologique actuels. Néanmoins, ces outils ainsi que les algorithmes de dépistage doivent encore être adaptés à la diversité génétique locale pour réduire le nombre de résultats indéterminés. Les algorithmes d'interprétation des résistances doivent être adaptés au polymorphisme des souches non-B et l'implication réelle des mutations mineures de ces souches sur l'apparition des résistances reste à déterminer.

Dans la partie SIV, nous avons développé et validé sur un panel de référence des ELISA SIV-spécifiques couvrant la majorité des souches SIV identifiées à ce jour, basés sur des peptides de la boucle V3 et des protéines recombinantes de la gp41 (5). L'utilisation de ce nouvel outil de diagnostic nous a permis de déterminer les prévalences réelles des infections à SIV chez plusieurs espèces de primates africains au Cameroun et de montrer que cette prévalence est très variable d'une espèce à l'autre. Nous avons aussi décrit pour la première fois la présence de deux types de lentivirus (SIVmus-1 et SIVmus-2) chez le moustac (*C. cephus*). Deux primates africains (le mandrill et le moustac) sont donc actuellement reconnus porteurs de plusieurs types de lentivirus. Ces résultats confirment la complexité de l'origine et de l'évolution des lentivirus de primates, de même que la dynamique de l'infection à SIV chez les primates africains. Enfin, nous avons identifié et caractérisé de nouvelles souches SIVmnd2 chez des mandrills sauvages au Cameroun. Aucune séquence SIVdrl-like n'a été identifiée chez les mandrills étudiés, contrairement aux données rapportées par des études précédentes (178, 405). Nous avons apporté quelques éclaircissements quant à l'origine des SIVmnd, mais il reste indispensable d'approfondir les études sur la diversité des SIVmnd et SIVdrl car leur origine et leur évolution sont des plus complexes. Tous ces primates porteurs

d'un ou plusieurs SIV sont couramment chassés et consommés en Afrique subsaharienne et représentent un risque majeur de santé publique. Les outils actuels de diagnostic du HIV bien qu'ayant permis d'identifier la plupart des lignées SIV connues, ne sont pas les plus adaptés à la recherche d'anticorps anti-SIV chez les primates non-humains et chez l'homme. Il est donc difficile de déterminer si des lentivirus autres que le SIVcpz et le SIVsmm ont été transmis à l'homme. Dans la continuité de ce travail, nous comptons améliorer les outils de diagnostic sérologiques et moléculaires et les utiliser pour rechercher d'éventuelles transmissions d'autres SIV du singe à l'homme. Nous comptons également rechercher et caractériser de nouveaux SIV chez les espèces de primates n'ayant pas encore été testées ou chez lesquelles seules des résultats sérologiques positifs ont été rapportés sans confirmation par amplifications et analyses de séquences. Ces travaux permettront de mieux comprendre l'origine et l'évolution des lentivirus simiens et celles de leur homologues humains HIV-1 et HIV-2.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abebe, A., C. L. Kuiken, J. Goudsmit, M. Valk, T. Messele, T. Sahlu, H. Yeneneh, A. Fontanet, F. De Wolf, and T. F. Rinke De Wit.** 1997. HIV type 1 subtype C in Addis Ababa, Ethiopia. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:1071-5.
2. **Abebe, A., G. Pollakis, A. L. Fontanet, B. Fisseha, B. Tegbaru, A. Kliphuis, G. Tesfaye, H. Negassa, M. Cornelissen, J. Goudsmit, and T. F. Rinke de Wit.** 2000. Identification of a genetic subcluster of HIV type 1 subtype C (C') widespread in Ethiopia. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:1909-14.
3. **Aghokeng, A. F., L. Ewane, B. Awazi, A. Nanfack, E. Delaporte, M. Peeters, and L. Zekeng.** 2004. Evaluation of Four Simple/Rapid Assays and Two Fourth-Generation ELISAs for the Identification of HIV Infection on a Serum Panel Representing the HIV-1 Group M Genetic Diversity in Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* **37**:1632-1640.
4. **Aghokeng, A. F., L. Ewane, B. Awazi, A. Nanfack, E. Delaporte, L. Zekeng, and M. Peeters.** 2005. Enfuvirtide binding domain is highly conserved in non-B HIV type 1 strains from Cameroon, West Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**:430-3.
5. **Aghokeng, A. F., W. Liu, F. Bibollet-Ruche, S. Loul, E. Mpoudi-Ngole, C. Laurent, J. M. Mwenda, D. K. Langat, G. K. Chege, H. M. McClure, E. Delaporte, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and M. Peeters.** 2006. Widely varying SIV prevalence rates in naturally infected primate species from Cameroon. *Virology* **345**:174-189.
6. **Aghokeng, A. F., and M. Peeters.** 2005. Simian immunodeficiency viruses (SIVs) in Africa. *J Neurovirol* **11 Suppl 1**:27-32.
7. **Agwale, S. M., C. Zeh, K. E. Robbins, L. Odama, A. Saekhou, A. Edubio, M. Njoku, N. Sani-Gwarzo, M. S. Gboun, F. Gao, M. Reitz, D. Hone, D. Pieniazek, C. Wambebe, and M. L. Kalish.** 2002. Molecular surveillance of HIV-1 field strains in Nigeria in preparation for vaccine trials. *Vaccine* **20**:2131-9.
8. **Ahmad, N., and S. Venkatesan.** 1988. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* **241**:1481-5.
9. **Aidoo, S., W. K. Ampofo, J. A. Brandful, S. V. Nuvor, J. K. Ansah, N. Nii-Trebi, J. S. Barnor, F. Apegyei, T. Sata, D. Ofori-Adjei, and K. Ishikawa.** 2001. Suitability of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus in Ghana, West Africa. *J Clin Microbiol* **39**:2572-5.
10. **Alaeus, A., K. Lidman, A. Bjorkman, J. Giesecke, and J. Albert.** 1999. Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *Aids* **13**:901-7.
11. **Alimonti, J. B., T. B. Ball, and K. R. Fowke.** 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* **84**:1649-61.

12. **Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-8.
13. **Allain, J. P., Y. Laurian, D. A. Paul, F. Verroust, M. Leuther, C. Gazengel, D. Senn, M. J. Larrieu, and C. Bossier.** 1987. Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p24 and gp41 in patients with hemophilia. Potential clinical importance. *N Engl J Med* **317**:1114-21.
14. **Allan, J. S., M. Short, M. E. Taylor, S. Su, V. M. Hirsch, P. R. Johnson, G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 1991. Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *J Virol* **65**:2816-28.
15. **Altfeld, M., T. M. Allen, X. G. Yu, M. N. Johnston, D. Agrawal, B. T. Korber, D. C. Montefiori, D. H. O'Connor, B. T. Davis, P. K. Lee, E. L. Maier, J. Harlow, P. J. Goulder, C. Brander, E. S. Rosenberg, and B. D. Walker.** 2002. HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature* **420**:434-9.
16. **Amendola, A., L. Bordi, C. Angeletti, U. Visco-Comandini, I. Abbate, G. Cappiello, M. A. Budabbus, O. A. Eljhawi, M. I. Mehabresh, E. Girardi, A. Antinori, G. Ippolito, and M. R. Capobianchi.** 2002. Underevaluation of HIV-1 plasma viral load by a commercially available assay in a cluster of patients infected with HIV-1 A/G circulating recombinant form (CRF02). *J Acquir Immune Defic Syndr* **31**:488-94.
17. **Amornkul, P. N., S. Tansuphasawadikul, K. Limpakarnjanarat, S. Likanonsakul, N. Young, B. Eampokalap, J. Kaewkungwal, T. Naiwatanakul, J. Von Bargen, D. J. Hu, and T. D. Mastro.** 1999. Clinical disease associated with HIV-1 subtype B' and E infection among 2104 patients in Thailand. *Aids* **13**:1963-9.
18. **Andersson, S.** 2001. HIV-2 and the immune responses. *AIDS Rev* **3**:11-23.
19. **Andersson, S., H. Norrgren, Z. da Silva, A. Biague, S. Bamba, S. Kwok, C. Christopherson, G. Biberfeld, and J. Albert.** 2000. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* **160**:3286-93.
20. **Apetrei, C., D. Descamps, G. Collin, I. LouSSERT-Ajaka, F. Damond, M. Duca, F. Simon, and F. Brun-Vezinet.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 subtype F reverse transcriptase sequence and drug susceptibility. *J Virol* **72**:3534-8.
21. **Apetrei, C., B. Gormus, I. Pandrea, M. Metzger, P. ten Haaft, L. N. Martin, R. Bohm, X. Alvarez, G. Koopman, M. Murphey-Corb, R. S. Veazey, A. A. Lackner, G. Baskin, J. Heeney, and P. A. Marx.** 2004. Direct inoculation of simian immunodeficiency virus from sooty mangabeys in black mangabeys (*Lophocebus*

- aterrimus*): first evidence of AIDS in a heterologous African species and different pathologic outcomes of experimental infection. *J Virol* **78**:11506-18.
22. **Apetrei, C., A. Kaur, N. W. Lerche, M. Metzger, I. Pandrea, J. Hardcastle, S. Falkenstein, R. Bohm, J. Koehler, V. Traina-Dorge, T. Williams, S. Staprans, G. Plauche, R. S. Veazey, H. McClure, A. A. Lackner, B. Gormus, D. L. Robertson, and P. A. Marx.** 2005. Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus SIVsm in U.S. primate centers unravels the origin of SIVmac and SIVstm. *J Virol* **79**:8991-9005.
 23. **Apetrei, C., I. Loussert-Ajaka, D. Descamps, F. Damond, S. Saragosti, F. Brun-Vezinet, and F. Simon.** 1996. Lack of screening test sensitivity during HIV-1 non-subtype B seroconversions. *Aids* **10**:F57-60.
 24. **Apetrei, C., and P. A. Marx.** 2005. African lentiviruses related to HIV. *J Neurovirol* **11 Suppl 1**:33-49.
 25. **Apetrei, C., P. A. Marx, and S. M. Smith.** 2004. The evolution of HIV and its consequences. *Infect Dis Clin North Am* **18**:369-94.
 26. **Apetrei, C., M. J. Metzger, D. Richardson, B. Ling, P. T. Telfer, P. Reed, D. L. Robertson, and P. A. Marx.** 2005. Detection and partial characterization of simian immunodeficiency virus SIVsm strains from bush meat samples from rural Sierra Leone. *J Virol* **79**:2631-6.
 27. **Apetrei, C., D. L. Robertson, and P. A. Marx.** 2004. The history of SIVS and AIDS: epidemiology, phylogeny and biology of isolates from naturally SIV infected non-human primates (NHP) in Africa. *Front Biosci* **9**:225-54.
 28. **Arrigo, S. J., and I. S. Chen.** 1991. Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev* **5**:808-19.
 29. **Asibey, E. O.** 1974. Wildlife as a source of protein in Africa south of the Sahara. *Biol Conser* **6**:32-39.
 30. **Autran, B., G. Carcelain, T. S. Li, C. Blanc, D. Mathez, R. Tubiana, C. Katlama, P. Debre, and J. Leibowitch.** 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* **277**:112-6.
 31. **Ayoub, A., P. Mauciere, P. M. Martin, P. Cunin, J. Mfoupouendoun, B. Njinku, S. Souquieres, and F. Simon.** 2001. HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerg Infect Dis* **7**:466-7.
 32. **Ayoub, A., S. Souquieres, B. Njinku, P. M. Martin, M. C. Muller-Trutwin, P. Roques, F. Barre-Sinoussi, P. Mauciere, F. Simon, and E. Nerrienet.** 2000. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *Aids* **14**:2623-5.

33. **Baier, M., C. Garber, C. Muller, K. Cichutek, and R. Kurth.** 1990. Complete nucleotide sequence of a simian immunodeficiency virus from African green monkeys: a novel type of intragroup divergence. *Virology* **176**:216-21.
34. **Bailes, E., R. R. Chaudhuri, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, B. Hahn, and P. M. Sharp.** 2002. The evolution of primate lentiviruses and the origins of AIDS, p. 65-96. *In* L. T. A. (ed.), *The molecular epidemiology of human viruses*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Mass.
35. **Bailes, E., F. Gao, F. Bibollet-Ruche, V. Courgnaud, M. Peeters, P. A. Marx, B. H. Hahn, and P. M. Sharp.** 2003. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* **300**:1713.
36. **Ball, R. A., and T. Kinchelow.** 2003. Injection site reactions with the HIV-1 fusion inhibitor enfuvirtide. *J Am Acad Dermatol* **49**:826-31.
37. **Barin, F., S. M'Boup, F. Denis, P. Kanki, J. S. Allan, T. H. Lee, and M. Essex.** 1985. Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* **2**:1387-9.
38. **Barin, F., M. F. McLane, J. S. Allan, T. H. Lee, J. E. Groopman, and M. Essex.** 1985. Virus envelope protein of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science* **228**:1094-6.
39. **Barker, E., C. E. Mackewicz, and J. A. Levy.** 1995. Effects of TH1 and TH2 cytokines on CD8+ cell response against human immunodeficiency virus: implications for long-term survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:11135-9.
40. **Barlow, K. L., A. O. Ajao, and J. P. Clewley.** 2003. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIVmonNG1) genome sequence from a mona monkey (*Cercopithecus mona*). *J Virol* **77**:6879-88.
41. **Barnett, S. W., K. K. Murthy, B. G. Herndier, and J. A. Levy.** 1994. An AIDS-like condition induced in baboons by HIV-2. *Science* **266**:642-6.
42. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
43. **Basavapathruni, A., C. M. Bailey, and K. S. Anderson.** 2004. Defining a molecular mechanism of synergy between nucleoside and nonnucleoside AIDS drugs. *J Biol Chem* **279**:6221-4.
44. **Beer, B. E., E. Bailes, G. Dapolito, B. J. Campbell, R. M. Goeken, M. K. Axthelm, P. D. Markham, J. Bernard, D. Zagury, G. Franchini, P. M. Sharp, and V. M. Hirsch.** 2000. Patterns of genomic sequence diversity among their simian

- immunodeficiency viruses suggest that L'Hoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*) are a natural lentivirus reservoir. *J Virol* **74**:3892-8.
45. **Beer, B. E., E. Bailes, R. Goeken, G. Dapolito, C. Coulibaly, S. G. Norley, R. Kurth, J. P. Gautier, A. Gautier-Hion, D. Vallet, P. M. Sharp, and V. M. Hirsch.** 1999. Simian immunodeficiency virus (SIV) from sun-tailed monkeys (*Cercopithecus solatus*): evidence for host-dependent evolution of SIV within the *C. lhoesti* superspecies. *J Virol* **73**:7734-44.
 46. **Beer, B. E., B. T. Foley, C. L. Kuiken, Z. Tooze, R. M. Goeken, C. R. Brown, J. Hu, M. St Claire, B. T. Korber, and V. M. Hirsch.** 2001. Characterization of novel simian immunodeficiency viruses from red-capped mangabeys from Nigeria (SIVrcmNG409 and -NG411). *J Virol* **75**:12014-27.
 47. **Belshe, R. B., G. J. Gorse, M. J. Mulligan, T. G. Evans, M. C. Keefer, J. L. Excler, A. M. Duliege, J. Tartaglia, W. I. Cox, J. McNamara, K. L. Hwang, A. Bradney, D. Montefiori, and K. J. Weinhold.** 1998. Induction of immune responses to HIV-1 by canarypox virus (ALVAC) HIV-1 and gp120 SF-2 recombinant vaccines in uninfected volunteers. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *Aids* **12**:2407-15.
 48. **Berkowitz, R. D., S. Alexander, C. Bare, V. Linnquist-Stepps, M. Bogan, M. E. Moreno, L. Gibson, E. D. Wieder, J. Kosek, C. A. Stoddart, and J. M. McCune.** 1998. CCR5- and CXCR4-utilizing strains of human immunodeficiency virus type 1 exhibit differential tropism and pathogenesis in vivo. *J Virol* **72**:10108-17.
 49. **Berman, P. W., W. Huang, L. Riddle, A. M. Gray, T. Wrin, J. Vennari, A. Johnson, M. Klaussen, H. Prashad, C. Kohne, C. deWit, and T. J. Gregory.** 1999. Development of bivalent (B/E) vaccines able to neutralize CCR5-dependent viruses from the United States and Thailand. *Virology* **265**:1-9.
 50. **Bibollet-Ruche, F., E. Bailes, F. Gao, X. Pourrut, K. L. Barlow, J. P. Clewley, J. M. Mwenda, D. K. Langat, G. K. Chege, H. M. McClure, E. Mpoudi-Ngole, E. Delaporte, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 2004. New simian immunodeficiency virus infecting De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*): evidence for a cercopithecus monkey virus clade. *J Virol* **78**:7748-62.
 51. **Bibollet-Ruche, F., C. Brengues, A. Galat-Luong, G. Galat, X. Pourrut, N. Vidal, F. Veas, J. P. Durand, and G. Cuny.** 1997. Genetic diversity of simian immunodeficiency viruses from West African green monkeys: evidence of multiple genotypes within populations from the same geographical locale. *J Virol* **71**:307-13.
 52. **Bibollet-Ruche, F., V. Courgnaud, X. Pourrut, E. Mpoudi, J. M. Mwenda, M. S. Hirsch, E. Delaporte, M. Peeters, F. Gao, G. M. Shaw, and B. Hahn.** Molecular characterisation of new primate lentiviruses from De Brazza, mona, and blue monkeys: evidence for host-dependent evolution within this group of viruses. *Presented at the 7th Conf. Retrovir. Opportun. Infect. Abstr.* 223, San Francisco 2000.

53. **Bibollet-Ruche, F., A. Galat-Luong, G. Cuny, P. Sarni-Manchado, G. Galat, J. P. Durand, X. Pourrut, and F. Veas.** 1996. Simian immunodeficiency virus infection in a patas monkey (*Erythrocebus patas*): evidence for cross-species transmission from African green monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaesus*) in the wild. *J Gen Virol* **77** (Pt 4):773-81.
54. **Bieniasz, P. D.** 2004. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* **5**:1109-15.
55. **Bieniasz, P. D., T. A. Grdina, H. P. Bogerd, and B. R. Cullen.** 1998. Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *Embo J* **17**:7056-65.
56. **Billich, A.** 2003. S-1360 Shionogi-GlaxoSmithKline. *Curr Opin Investig Drugs* **4**:206-9.
57. **Biti, R., R. Ffrench, J. Young, B. Bennetts, G. Stewart, and T. Liang.** 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* **3**:252-3.
58. **Blackard, J. T., D. E. Cohen, and K. H. Mayer.** 2002. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* **34**:1108-14.
59. **Bodelle, P., A. Vallari, R. Coffey, C. P. McArthur, M. Beyeme, S. G. Devare, G. Schochetman, and C. A. Brennan.** 2004. Identification and genomic sequence of an HIV type 1 group N isolate from Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:902-8.
60. **Bolognesi, D. P., and T. J. Matthews.** 1998. HIV vaccines. Viral envelope fails to deliver? *Nature* **391**:638-9.
61. **Bour, S., and K. Strebel.** 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect* **5**:1029-39.
62. **Brennan, C. A., J. Yamaguchi, A. S. Vallari, R. K. Hickman, and S. G. Devare.** 1997. Genetic variation in human immunodeficiency virus type 2: identification of a unique variant from human plasma. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:401-4.
63. **Brenner, B., D. Turner, M. Oliveira, D. Moisi, M. Detorio, M. Carobene, R. G. Marlink, J. Schapiro, M. Roger, and M. A. Wainberg.** 2003. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Aids* **17**:F1-5.
64. **Broder, C. C., and A. Jones-Trower.** 1999. Coreceptor Use by Primate Lentiviruses, p. 517-541. *In* C. L. Kuiken, B. T. Foley, B. Hahn, B. T. Korber, F. McCutchan, P. A. Marx, J. W. Mellors, J. I. Mullins, J. Sodroski, and S. Wolinsky (ed.), *Human Retroviruses and AIDS 1999*. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.

65. **Brun-Vézinet, F., and M. Wainberg.** 2003. HIV: structure, multiplication et physiopathologie, p. 313-329. In J-M. Huraux, J-C. Nicolas, H. Agut, and H. Peigue-lafeuille. *Traité de Virologie Médicale*. Estem, Paris.
66. **Burda, S. T., F. A. Konings, C. A. Williams, C. Anyangwe, and P. N. Nyambi.** 2004. HIV-1 CRF09_cpx circulates in the North West Province of Cameroon where CRF02_AG infections predominate and recombinant strains are common. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:1358-63.
67. **Cancio, R., S. Spadari, and G. Maga.** 2004. Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass. *Biochem J* **383**:475-82.
68. **Cao, H., I. Mani, R. Vincent, R. Mugerwa, P. Mugenyi, P. Kanki, J. Ellner, and B. D. Walker.** 2000. Cellular immunity to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) clades: relevance to HIV-1 vaccine trials in Uganda. *J Infect Dis* **182**:1350-6.
69. **Caride, E., K. Hertogs, B. Larder, P. Dehertogh, R. Brindeiro, E. Machado, C. A. de Sa, W. A. Eyer-Silva, F. S. Sion, L. F. Passioni, J. A. Menezes, A. R. Calazans, and A. Tanuri.** 2001. Genotypic and phenotypic evidence of different drug-resistance mutation patterns between B and non-B subtype isolates of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virus Genes* **23**:193-202.
70. **Carr, J. K., J. N. Torimiro, N. D. Wolfe, M. N. Eitel, B. Kim, E. Sanders-Buell, L. L. Jagodzinski, D. Gotte, D. S. Burke, D. L. Birx, and F. E. McCutchan.** 2001. The AG recombinant IbNG and novel strains of group M HIV-1 are common in Cameroon. *Virology* **286**:168-81.
71. **Cavaleiro, R., A. E. Sousa, A. Loureiro, and R. M. Victorino.** 2000. Marked immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein in spite of the lower HIV-2 pathogenicity. *Aids* **14**:2679-86.
72. **Centers for Disease Control.** 1985. Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing acquired immunodeficiency syndrome. *Morbidity and Mortality* **34**:1-5.
73. **Charneau, P., A. M. Borman, C. Quillent, D. Guetard, S. Chamaret, J. Cohen, G. Remy, L. Montagnier, and F. Clavel.** 1994. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* **205**:247-53.
74. **Chen, Z., A. Gettie, D. D. Ho, and P. A. Marx.** 1998. Primary SIVsm isolates use the CCR5 coreceptor from sooty mangabeys naturally infected in west Africa: a comparison of coreceptor usage of primary SIVsm, HIV-2, and SIVmac. *Virology* **246**:113-24.
75. **Chen, Z., D. Kwon, Z. Jin, S. Monard, P. Telfer, M. S. Jones, C. Y. Lu, R. F. Aguilar, D. D. Ho, and P. A. Marx.** 1998. Natural infection of a homozygous delta24 CCR5 red-capped mangabey with an R2b-tropic simian immunodeficiency virus. *J Exp Med* **188**:2057-65.

76. **Chen, Z., A. Luckay, D. L. Sodora, P. Telfer, P. Reed, A. Gettie, J. M. Kanu, R. F. Sadek, J. Yee, D. D. Ho, L. Zhang, and P. A. Marx.** 1997. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol* **71**:3953-60.
77. **Chen, Z., P. Telfer, A. Gettie, P. Reed, L. Zhang, D. D. Ho, and P. A. Marx.** 1996. Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J Virol* **70**:3617-27.
78. **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**:1629-32.
79. **Chermann, J. C., F. Barre-Sinoussi, C. Dauguet, F. Brun-Vezinet, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother* **32**:48-53.
80. **Chowers, M. Y., C. A. Spina, T. J. Kwoh, N. J. Fitch, D. D. Richman, and J. C. Guatelli.** 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol* **68**:2906-14.
81. **Cilliers, T., T. Patience, C. Pillay, M. Papathanasopoulos, and L. Morris.** 2004. Sensitivity of HIV type 1 subtype C isolates to the entry inhibitor T-20. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:477-82.
82. **Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**:691-5.
83. **Clewley, J. P., J. C. Lewis, D. W. Brown, and E. L. Gadsby.** 1998. A novel simian immunodeficiency virus (SIVdrl) pol sequence from the drill monkey, *Mandrillus leucophaeus*. *J Virol* **72**:10305-9.
84. **Coffin, J. M.** 1992. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**:143-64.
85. **Coffin, J. M.** 1992. Retroviral DNA integration. *Dev Biol Stand* **76**:141-51.
86. **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**:935-44.
87. **Constantine, N. T., J. D. Callahan, and D. M. Watts.** 1992. Retroviral testing: Essentials for quality control and laboratory diagnosis. CRC, Ann Arbor, Michigan.

88. **Constantine, N. T., and L. Iana.** 2003. Immunoassays for the diagnosis of infectious diseases, p. 218-233. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, N. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
89. **Constantine, N. T., L. Zekeng, A. K. Sangare, L. Gurtler, R. Saville, H. Anhary, and C. Wild.** 1997. Diagnostic challenges for rapid human immunodeficiency virus assays. Performance using HIV-1 group O, HIV-1 group M, and HIV-2 samples. *J Hum Virol* **1**:45-51.
90. **Constantine, N. T., and H. Zink.** 2005. HIV testing technologies after two decades of evolution. *Indian J Med Res* **121**:519-38.
91. **Conticello, S. G., R. S. Harris, and M. S. Neuberger.** 2003. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* **13**:2009-13.
92. **Cooper, D. A., and J. M. Lange.** 2004. Peptide inhibitors of virus-cell fusion: enfuvirtide as a case study in clinical discovery and development. *Lancet Infect Dis* **4**:426-36.
93. **Corbet, S., M. C. Muller-Trutwin, P. Versmisse, S. Delarue, A. Ayoub, J. Lewis, S. Brunak, P. Martin, F. Brun-Vezinet, F. Simon, F. Barre-Sinoussi, and P. Maucuer.** 2000. env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol* **74**:529-34.
94. **Cordes, F. S., A. Kukol, L. R. Forrest, I. T. Arkin, M. S. Sansom, and W. B. Fischer.** 2001. The structure of the HIV-1 Vpu ion channel: modelling and simulation studies. *Biochim Biophys Acta* **1512**:291-8.
95. **Courgnaud, V., B. Abela, X. Pourrut, E. Mpoudi-Ngole, S. Loul, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2003. Identification of a new simian immunodeficiency virus lineage with a vpu gene present among different cercopithecus monkeys (*C. mona*, *C. cephus*, and *C. nictitans*) from Cameroon. *J Virol* **77**:12523-34.
96. **Courgnaud, V., P. Formenty, C. Akoua-Koffi, R. Noe, C. Boesch, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2003. Partial molecular characterization of two simian immunodeficiency viruses (SIV) from African colobids: SIVwrc from Western red colobus (*Piliocolobus badius*) and SIVolc from olive colobus (*Procolobus verus*). *J Virol* **77**:744-8.
97. **Courgnaud, V., X. Pourrut, F. Bibollet-Ruche, E. Mpoudi-Ngole, A. Bourgeois, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2001. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus from guereza colobus monkeys (*Colobus guereza*) in Cameroon: a new lineage in the nonhuman primate lentivirus family. *J Virol* **75**:857-66.

98. **Courgnaud, V., M. Salemi, X. Pourrut, E. Mpoudi-Ngole, B. Abela, P. Auzel, F. Bibollet-Ruche, B. Hahn, A. M. Vandamme, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2002. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a vpu gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *J Virol* **76**:8298-309.
99. **Crowther, J. R.** 2001. The ELISA Guidebook. In J. M. Walker (ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 149. Humana Press, Totowa, NJ.
100. **Curlin, M. E., G. S. Gottlieb, S. E. Hawes, P. S. Sow, I. Ndoye, C. W. Critchlow, N. B. Kiviat, and J. I. Mullins.** 2004. No evidence for recombination between HIV type 1 and HIV type 2 within the envelope region in dually seropositive individuals from Senegal. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:958-63.
101. **Daar, E. S., S. Little, J. Pitt, J. Santangelo, P. Ho, N. Harawa, P. Kerndt, J. V. Glorgi, J. Bai, P. Gaut, D. D. Richman, S. Mandel, and S. Nichols.** 2001. Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network. *Ann Intern Med* **134**:25-9.
102. **Damond, F., C. Apetrei, D. L. Robertson, S. Souquiere, A. Lepretre, S. Matheron, J. C. Plantier, F. Brun-Vezinet, and F. Simon.** 2001. Variability of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infecting patients living in France. *Virology* **280**:19-30.
103. **Damond, F., G. Collin, D. Descamps, S. Matheron, S. Pueyo, A. Taieb, P. Campa, A. Benard, G. Chene, and F. Brun-Vezinet.** 2005. Improved sensitivity of human immunodeficiency virus type 2 subtype B plasma viral load assay. *J Clin Microbiol* **43**:4234-6.
104. **Damond, F., M. Worobey, P. Campa, I. Farfara, G. Colin, S. Matheron, F. Brun-Vezinet, D. L. Robertson, and F. Simon.** 2004. Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:666-72.
105. **Daniel, M. D., N. L. Letvin, N. W. King, M. Kannagi, P. K. Sehgal, R. D. Hunt, P. J. Kanki, M. Essex, and R. C. Desrosiers.** 1985. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**:1201-4.
106. **Daniel, M. D., Y. Li, Y. M. Naidu, P. J. Durda, D. K. Schmidt, C. D. Troup, D. P. Silva, J. J. MacKey, H. W. Kestler, 3rd, P. K. Sehgal, et al.** 1988. Simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *J Virol* **62**:4123-8.
107. **Dax, E. M.** 1999. Serological testing algorithms for the diagnosis of HIV infection. *Aids* **13**:133-4.
108. **Dazza, M. C., M. Ekwilanga, M. Nende, K. B. Shamamba, P. Bitshi, D. Paraskevis, and S. Saragosti.** 2005. Characterization of a novel vpu-harboring simian

- immunodeficiency virus from a Dent's Mona monkey (*Cercopithecus mona denti*). *J Virol* **79**:8560-71.
109. **De Clercq, E.** 1995. Toward improved anti-HIV chemotherapy: therapeutic strategies for intervention with HIV infections. *J Med Chem* **38**:2491-517.
110. **De Cock, K. M., G. Adjorlolo, E. Ekpini, T. Sibailly, J. Kouadio, M. Maran, K. Brattegaard, K. M. Vetter, R. Doorly, and H. D. Gayle.** 1993. Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *Jama* **270**:2083-6.
111. **De Leys, R., B. Vanderborcht, M. Vanden Haesevelde, L. Heyndrickx, A. van Geel, C. Wauters, R. Bernaerts, E. Saman, P. Nijs, B. Willems, et al.** 1990. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* **64**:1207-16.
112. **De Luca, A., A. Cingolani, S. Di Giambenedetto, M. P. Trotta, F. Baldini, M. G. Rizzo, A. Bertoli, G. Liuzzi, P. Narciso, R. Murri, A. Ammassari, C. F. Perno, and A. Antinori.** 2003. Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *J Infect Dis* **187**:1934-43.
113. **de Mendoza, C., M. Koppelman, B. Montes, V. Ferre, V. Soriano, H. Cuypers, M. Segondy, and T. Oosterlaken.** 2005. Multicenter evaluation of the NucliSens EasyQ HIV-1 v1.1 assay for the quantitative detection of HIV-1 RNA in plasma. *J Virol Methods* **127**:54-9.
114. **Delaporte, E., W. Janssens, M. Peeters, A. Buve, G. Dibanga, J. L. Perret, V. Ditsambou, J. R. Mba, M. C. Courbot, A. Georges, A. Bourgeois, B. Samb, D. Henzel, L. Heyndrickx, K. Fransen, G. van der Groen, and B. Larouze.** 1996. Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Gabon, 1986-1994. *Aids* **10**:903-10.
115. **Demarchi, F., F. d'Adda di Fagagna, A. Falaschi, and M. Giacca.** 1996. Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**:4427-37.
116. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**:661-6.
117. **Descamps, D., C. Apetrei, G. Collin, F. Damond, F. Simon, and F. Brun-Vezinet.** 1998. Naturally occurring decreased susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors. *Aids* **12**:1109-11.
118. **Descamps, D., G. Collin, F. Letourneur, C. Apetrei, F. Damond, I. Loussert-Ajaka, F. Simon, S. Saragosti, and F. Brun-Vezinet.** 1997. Susceptibility of human

- immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. *J Virol* **71**:8893-8.
119. **Di Marzio, P., S. Choe, M. Ebright, R. Knoblauch, and N. R. Landau.** 1995. Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* **69**:7909-16.
 120. **Elbeik, T., W. G. Alvord, R. Trichavaroj, M. de Souza, R. Dewar, A. Brown, D. Chernoff, N. L. Michael, P. Nassos, K. Hadley, and V. L. Ng.** 2002. Comparative analysis of HIV-1 viral load assays on subtype quantification: Bayer Versant HIV-1 RNA 3.0 versus Roche Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**:330-9.
 121. **Ellis, B. R., E. Munene, D. Elliott, J. Robinson, M. G. Otsyula, and S. F. Michael.** 2004. Seroprevalence of simian immunodeficiency virus in wild and captive born Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) in Kenya. *Retrovirology* **1**:34.
 122. **Emau, P., H. M. McClure, M. Isahakia, J. G. Else, and P. N. Fultz.** 1991. Isolation from African Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **65**:2135-40.
 123. **Emilie, D., M. Burgard, C. Lascoux-Combe, M. Laughlin, R. Krzysiek, C. Pignon, A. Rudent, J. M. Molina, J. M. Livrozet, F. Souala, G. Chene, L. Grangeot-Keros, P. Galanaud, D. Sereni, and C. Rouzioux.** 2001. Early control of HIV replication in primary HIV-1 infection treated with antiretroviral drugs and pegylated IFN alpha: results from the Primoferon A (ANRS 086) Study. *Aids* **15**:1435-7.
 124. **Eshleman, S. H., G. Becker-Pergola, M. Deseyve, L. A. Guay, M. Mracna, T. Fleming, S. Cunningham, P. Musoke, F. Mmiro, and J. B. Jackson.** 2001. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype on women receiving single-dose nevirapine prophylaxis to prevent hiv-1 vertical transmission (hiv network for prevention trials 012 study). *J Infect Dis* **184**:914-7.
 125. **Eshleman, S. H., L. A. Guay, A. Mwatha, E. Brown, P. Musoke, F. Mmiro, and J. B. Jackson.** 2005. Comparison of mother-to-child transmission rates in Ugandan women with subtype A versus D HIV-1 who received single-dose nevirapine prophylaxis: HIV Network For Prevention Trials 012. *J Acquir Immune Defic Syndr* **39**:593-7.
 126. **Esparza, J., and S. Osmanov.** 2003. HIV vaccines: a global perspective. *Curr Mol Med* **3**:183-93.
 127. **Espeseth, A. S., P. Felock, A. Wolfe, M. Witmer, J. Grobler, N. Anthony, M. Egbertson, J. Y. Melamed, S. Young, T. Hamill, J. L. Cole, and D. J. Hazuda.** 2000. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11244-9.

128. **Fang, G., B. Weiser, C. Kuiken, S. M. Philpott, S. Rowland-Jones, F. Plummer, J. Kimani, B. Shi, R. Kaul, J. Bwayo, O. Anzala, and H. Burger.** 2004. Recombination following superinfection by HIV-1. *Aids* **18**:153-9.
129. **Felber, B. K., M. Hadzopoulou-Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland, and G. N. Pavlakis.** 1989. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:1495-9.
130. **Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-7.
131. **Ferrari, G., W. Neal, A. Jones, N. Olender, J. Ottinger, R. Ha, M. J. McElrath, P. Goepfert, and K. J. Weinhold.** 2001. CD8 CTL responses in vaccines: emerging patterns of HLA restriction and epitope recognition. *Immunol Lett* **79**:37-45.
132. **Fomsgaard, A., V. M. Hirsch, J. S. Allan, and P. R. Johnson.** 1991. A highly divergent proviral DNA clone of SIV from a distinct species of African green monkey. *Virology* **182**:397-402.
133. **Fonjungo, P. N., E. N. Mpoudi, J. N. Torimiro, G. A. Alemnji, L. T. Eno, J. N. Nkengasong, F. Gao, M. Rayfield, T. M. Folks, D. Pieniazek, and R. B. Lal.** 2000. Presence of diverse human immunodeficiency virus type 1 viral variants in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:1319-24.
134. **Fransen, K., P. Zhong, H. De Beenhouwer, G. Carpels, M. Peeters, J. Louwagie, W. Janssens, P. Piot, and G. van der Groen.** 1994. Design and evaluation of new, highly sensitive and specific primers for polymerase chain reaction detection of HIV-1 infected primary lymphocytes. *Mol Cell Probes* **8**:317-22.
135. **Friborg, J., A. Ladha, H. Gottlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen.** 1995. Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **8**:10-22.
136. **Fukasawa, M., T. Miura, A. Hasegawa, S. Morikawa, H. Tsujimoto, K. Miki, T. Kitamura, and M. Hayami.** 1988. Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group. *Nature* **333**:457-61.
137. **Fultz, P. N., T. P. Gordon, D. C. Anderson, and H. M. McClure.** 1990. Prevalence of natural infection with simian immunodeficiency virus and simian T-cell leukemia virus type I in a breeding colony of sooty mangabey monkeys. *Aids* **4**:619-25.
138. **Fultz, P. N., H. M. McClure, D. C. Anderson, R. B. Swenson, R. Anand, and A. Srinivasan.** 1986. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5286-90.

139. **Gagneux, P., C. Wills, U. Gerloff, D. Tautz, P. A. Morin, C. Boesch, B. Fruth, G. Hohmann, O. A. Ryder, and D. S. Woodruff.** 1999. Mitochondrial sequences show diverse evolutionary histories of African hominoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5077-82.
140. **Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**:436-41.
141. **Gao, F., B. T. Korber, E. Weaver, H. X. Liao, B. H. Hahn, and B. F. Haynes.** 2004. Centralized immunogens as a vaccine strategy to overcome HIV-1 diversity. *Expert Rev Vaccines* **3**:S161-8.
142. **Gao, F., D. L. Robertson, C. D. Carruthers, S. G. Morrison, B. Jian, Y. Chen, F. Barre-Sinoussi, M. Girard, A. Srinivasan, A. G. Abimiku, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1998. A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**:5680-98.
143. **Gao, F., N. Vidal, Y. Li, S. A. Trask, Y. Chen, L. G. Kostrikis, D. D. Ho, J. Kim, M. D. Oh, K. Choe, M. Salminen, D. L. Robertson, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and M. Peeters.** 2001. Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:675-88.
144. **Gao, F., L. Yue, D. L. Robertson, S. C. Hill, H. Hui, R. J. Biggar, A. E. Neequaye, T. M. Whelan, D. D. Ho, G. M. Shaw, et al.** 1994. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* **68**:7433-47.
145. **Gao, F., L. Yue, A. T. White, P. G. Pappas, J. Barchue, A. P. Hanson, B. M. Greene, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**:495-9.
146. **Garcia, J. V., and A. D. Miller.** 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**:508-11.
147. **Gautier-Hion, A., M. Colyn, and J. P. Gautier.** 1999. Histoire naturelle des primates d'Afrique centrale. ECOFAC, Libreville.
148. **Geist, V.** 1988. How markets in wildlife meat and parts, and the sale of hunting privileges, jeopardize wildlife conservation. *Conservation Biology* **2**:15-26.
149. **Georges-Courbot, M. C., C. Y. Lu, M. Makuwa, P. Telfer, R. Onanga, G. Dubreuil, Z. Chen, S. M. Smith, A. Georges, F. Gao, B. H. Hahn, and P. A. Marx.** 1998. Natural infection of a household pet red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus. *J Virol* **72**:600-8.

150. **Goff, S. P.** 2004. Retrovirus restriction factors. *Mol Cell* **16**:849-59.
151. **Gomes, P., I. Diogo, M. F. Gonsalves, P. Carvalho, J. Cabanas, L. M. C., and R. Camacho.** 2002. Different pathways to nelfinavir genotypic resistance in HIV-1 subtypes B and G. *Presented at the 9th Conf. Retrovir. Opportun. Infect. Abstr. 46*, Seattle 2002.
152. **Gonder, M. K., J. F. Oates, T. R. Disotell, M. R. Forstner, J. C. Morales, and D. J. Melnick.** 1997. A new west African chimpanzee subspecies? *Nature* **388**:337.
153. **Grimm, T. A., B. E. Beer, V. M. Hirsch, and K. A. Clouse.** 2003. Simian immunodeficiency viruses from multiple lineages infect human macrophages: implications for cross-species transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* **32**:362-9.
154. **Grossman, Z., V. Istomin, D. Averbuch, M. Lorber, K. Risenberg, I. Levi, M. Chowers, M. Burke, N. Bar Yaacov, and J. M. Schapiro.** 2004. Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. *Aids* **18**:909-15.
155. **Grossman, Z., E. Paxinos, D. Auerbuch, S. Maayan, N. Parkin, D. Engelhard, M. Lorber, E. Kedem, F. Mileguir, N. Vardinon, Z. Bentwich, C. J. Petropoulos, and J. M. Schapiro.** D30N is not the preferred resistance pathway in subtype C patients treated with nelfinavir. *Presented at the XI international HIV drug resistance workshop. Abstr. S39*, Seville, July 2-5, 2002.
156. **Groupe Technique Central du Programme National de Lutte contre le SIDA.** 2000. Plan stratégique de lutte contre le SIDA au Cameroun 2000-2005. Comité National de Lutte contre le SIDA.
157. **Groves, C.** 2001. Primate taxonomy. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
158. **Gupta, K., M. Hudgens, L. Corey, M. J. McElrath, K. Weinhold, D. C. Montefiori, G. J. Gorse, S. E. Frey, M. C. Keefer, T. G. Evans, R. Dolin, D. H. Schwartz, C. Harro, B. Graham, P. W. Spearman, M. Mulligan, and P. Goepfert.** 2002. Safety and immunogenicity of a high-titered canarypox vaccine in combination with rgp120 in a diverse population of HIV-1-uninfected adults: AIDS Vaccine Evaluation Group Protocol 022A. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**:254-61.
159. **Gurtler, L., A. Muhlbacher, U. Michl, H. Hofmann, G. G. Paggi, V. Bossi, R. Thorstensson, G. V. R, A. Eiras, J. M. Hernandez, W. Melchior, F. Donie, and B. Weber.** 1998. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. *J Virol Methods* **75**:27-38.
160. **Gurtler, L. G., P. H. Hauser, J. Eberle, A. von Brunn, S. Knapp, L. Zekeng, J. M. Tsague, and L. Kaptue.** 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* **68**:1581-5.

161. **Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp.** 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**:607-14.
162. **Hanna, G., J. P. Lalezari, J. Hellinger, D. Wolh, T. Masterson, W. Fiske, J. Kadow, P. Lin, M. Giordano, R. Colonna, and D. Grasela.** Antiviral Activity, Safety, and Tolerability of a Novel, Oral Small-molecule HIV-1 Attachment Inhibitor, BMS-488043, in HIV-1-infected Subjects. *Presented at the 11th Conf. Retrovir. Opportun. Infect. Abstr.* 535, San Francisco 2004.
163. **He, J., S. Choe, R. Walker, P. Di Marzio, D. O. Morgan, and N. R. Landau.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* **69**:6705-11.
164. **Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7311-5.
165. **Hirsch, M. S., F. Brun-Vezinet, B. Clotet, B. Conway, D. R. Kuritzkes, R. T. D'Aquila, L. M. Demeter, S. M. Hammer, V. A. Johnson, C. Loveday, J. W. Mellors, D. M. Jacobsen, and D. D. Richman.** 2003. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* **37**:113-28.
166. **Hirsch, M. S., B. Conway, R. T. D'Aquila, V. A. Johnson, F. Brun-Vezinet, B. Clotet, L. M. Demeter, S. M. Hammer, D. M. Jacobsen, D. R. Kuritzkes, C. Loveday, J. W. Mellors, S. Vella, and D. D. Richman.** 1998. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society USA Panel. *Jama* **279**:1984-91.
167. **Hirsch, V. M., B. J. Campbell, E. Bailes, R. Goeken, C. Brown, W. R. Elkins, M. Axthelm, M. Murphey-Corb, and P. M. Sharp.** 1999. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIV) from L'Hoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*): implications for the origins of SIVmnd and other primate lentiviruses. *J Virol* **73**:1036-45.
168. **Hirsch, V. M., G. A. Dapolito, S. Goldstein, H. McClure, P. Emau, P. N. Fultz, M. Isahakia, R. Lenroot, G. Myers, and P. R. Johnson.** 1993. A distinct African lentivirus from Sykes' monkeys. *J Virol* **67**:1517-28.
169. **Hirsch, V. M., and P. R. Johnson.** 1994. Pathogenic diversity of simian immunodeficiency viruses. *Virus Res* **32**:183-203.

170. **Hirsch, V. M., C. McGann, G. Dapolito, S. Goldstein, A. Ogen-Odoi, B. Biryawaho, T. Lakwo, and P. R. Johnson.** 1993. Identification of a new subgroup of SIVagm in tantalus monkeys. *Virology* **197**:426-30.
171. **Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, and P. R. Johnson.** 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**:389-92.
172. **Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-6.
173. **Hoelscher, M., W. E. Dowling, E. Sanders-Buell, J. K. Carr, M. E. Harris, A. Thomschke, M. L. Robb, D. L. Birx, and F. E. McCutchan.** 2002. Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay. *Aids* **16**:2055-64.
174. **Hoen, B.** 2004. Primo-infection par le VIH, p. 67-73. *In* P.-M. Girard, C. Katlama, and G. Pialoux (ed.), VIH édition 2004. Doin, Paris.
175. **Holguin, A., and V. Soriano.** 2002. Resistance to antiretroviral agents in individuals with HIV-1 non-B subtypes. *HIV Clin Trials* **3**:403-11.
176. **Holmes, E. C.** 2003. Molecular clocks and the puzzle of RNA virus origins. *J Virol* **77**:3893-7.
177. **Hu, D. J., S. Vanichseni, T. D. Mastro, S. Raktham, N. L. Young, P. A. Mock, S. Subbarao, B. S. Parekh, L. Srisuwanvilai, R. Sutthent, C. Wasi, W. Heneine, and K. Choopanya.** 2001. Viral load differences in early infection with two HIV-1 subtypes. *Aids* **15**:683-91.
178. **Hu, J., W. M. Switzer, B. T. Foley, D. L. Robertson, R. M. Goeken, B. T. Korber, V. M. Hirsch, and B. E. Beer.** 2003. Characterization and comparison of recombinant simian immunodeficiency virus from drill (*Mandrillus leucophaeus*) and mandrill (*Mandrillus sphinx*) isolates. *J Virol* **77**:4867-80.
179. **Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**:754-5.
180. **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**:356-9.
181. **Jabbar, M. A.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: roles in virus release and CD4 downregulation. *Curr Top Microbiol Immunol* **193**:107-20.

182. **Jacobson, J. M., R. J. Israel, I. Lowy, N. A. Ostrow, L. S. Vassilatos, M. Barish, D. N. Tran, B. M. Sullivan, T. J. Ketas, T. J. O'Neill, K. A. Nagashima, W. Huang, C. J. Petropoulos, J. P. Moore, P. J. Maddon, and W. C. Olson.** 2004. Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:423-9.
183. **Jacobson, J. M., I. Lowy, C. V. Fletcher, T. J. O'Neill, D. N. Tran, T. J. Ketas, A. Trkola, M. E. Klotman, P. J. Maddon, W. C. Olson, and R. J. Israel.** 2000. Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. *J Infect Dis* **182**:326-9.
184. **Jacotot, E., L. Ravagnan, M. Loeffler, K. F. Ferri, H. L. Vieira, N. Zamzami, P. Costantini, S. Druillennec, J. Hoebeke, J. P. Briand, T. Irinopoulou, E. Daugas, S. A. Susin, D. Cointe, Z. H. Xie, J. C. Reed, B. P. Roques, and G. Kroemer.** 2000. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* **191**:33-46.
185. **Jaleco, A. C., M. J. Covas, and R. M. Victorino.** 1994. Analysis of lymphocyte cell death and apoptosis in HIV-2-infected patients. *Clin Exp Immunol* **98**:185-9.
186. **Janssens, W., A. Buve, and J. N. Nkengasong.** 1997. The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *Aids* **11**:705-12.
187. **Janssens, W., K. Fransen, M. Peeters, L. Heyndrickx, J. Motte, L. Bedjabaga, E. Delaporte, P. Piot, and G. van der Groen.** 1994. Phylogenetic analysis of a new chimpanzee lentivirus SIVcpz-gab2 from a wild-captured chimpanzee from Gabon. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:1191-2.
188. **Jeeninga, R. E., M. Hoogenkamp, M. Armand-Ugon, M. de Baar, K. Verhoef, and B. Berkhout.** 2000. Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol* **74**:3740-51.
189. **Jetzt, A. E., H. Yu, G. J. Klarmann, Y. Ron, B. D. Preston, and J. P. Dougherty.** 2000. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **74**:1234-40.
190. **Ji, J., and L. A. Loeb.** 1994. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying a hypervariable region of the HIV-1 env gene. *Virology* **199**:323-30.
191. **Jin, M. J., H. Hui, D. L. Robertson, M. C. Muller, F. Barre-Sinoussi, V. M. Hirsch, J. S. Allan, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1994. Mosaic genome structure of simian immunodeficiency virus from west African green monkeys. *Embo J* **13**:2935-47.
192. **Jin, M. J., J. Rogers, J. E. Phillips-Conroy, J. S. Allan, R. C. Desrosiers, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1994. Infection of a yellow baboon with simian

- immunodeficiency virus from African green monkeys: evidence for cross-species transmission in the wild. *J Virol* **68**:8454-60.
193. **Johnson, P. R., A. Fomsgaard, J. Allan, M. Gravell, W. T. London, R. A. Olmsted, and V. M. Hirsch.** 1990. Simian immunodeficiency viruses from African green monkeys display unusual genetic diversity. *J Virol* **64**:1086-92.
194. **Jolly, C., J. E. Phillips-Conroy, T. R. Turner, S. Broussard, and J. S. Allan.** 1996. SIVagm incidence over two decades in a natural population of Ethiopian grivet monkeys (*Cercopithecus aethiops aethiops*). *J Med Primatol* **25**:78-83.
195. **Jones, D. T., W. R. Taylor, and J. M. Thornton.** 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**:275-82.
196. **Jowett, J. B., V. Planelles, B. Poon, N. P. Shah, M. L. Chen, and I. S. Chen.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* **69**:6304-13.
197. **Kaleebu, P., N. French, C. Mahe, D. Yirrell, C. Watera, F. Lyagoba, J. Nakiyingi, A. Rutebemberwa, D. Morgan, J. Weber, C. Gilks, and J. Whitworth.** 2002. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis* **185**:1244-50.
198. **Kanki, P., S. M'Boup, R. Marlink, K. Travers, C. C. Hsieh, A. Gueye, C. Boye, J. L. Sankale, C. Donnelly, W. Leisenring, et al.** 1992. Prevalence and risk determinants of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in west African female prostitutes. *Am J Epidemiol* **136**:895-907.
199. **Kanki, P. J., D. J. Hamel, J. L. Sankale, C. Hsieh, I. Thior, F. Barin, S. A. Woodcock, A. Gueye-Ndiaye, E. Zhang, M. Montano, T. Siby, R. Marlink, N. D. I, M. E. Essex, and M. B. S.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis* **179**:68-73.
200. **Kanki, P. J., M. Peeters, and A. Gueye-Ndiaye.** 1997. Virology of HIV-1 and HIV-2: implications for Africa. *Aids* **11 Suppl B**:S33-42.
201. **Kanki, P. J., K. U. Travers, M. B. S, C. C. Hsieh, R. G. Marlink, N. A. Gueye, T. Siby, I. Thior, M. Hernandez-Avila, J. L. Sankale, et al.** 1994. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* **343**:943-6.
202. **Kannangai, R., S. Ramalingam, R. C. Castillo, P. G. Babu, T. J. John, G. Sridharan, and D. H. Schwartz.** 1999. HIV-2 status in southern India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**:30-1.
203. **Kantor, R., and D. Katzenstein.** 2004. Drug resistance in non-subtype B HIV-1. *J Clin Virol* **29**:152-9.

204. **Katlama, C., G. Pialoux, and P.-M. Girard.** 2004. Traitements antirétroviraux, p. 299-330. In P.-M. Girard, C. Katlama, and G. Pialoux (ed.), VIH Edition 2004. Doin, Paris.
205. **Kessler, M., and M. B. Mathews.** 1992. Premature termination and processing of human immunodeficiency virus type 1-promoted transcripts. *J Virol* **66**:4488-96.
206. **Khan, M. A., H. Akari, S. Kao, C. Aberham, D. Davis, A. Buckler-White, and K. Strebel.** 2002. Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease may be correlated with Vif function. *J Virol* **76**:9112-23.
207. **Kilby, J. M., and J. J. Eron.** 2003. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med* **348**:2228-38.
208. **Kils-Hutten, L., R. Cheynier, S. Wain-Hobson, and A. Meyerhans.** 2001. Phylogenetic reconstruction of inpatient evolution of human immunodeficiency virus type 1: predominance of drift and purifying selection. *J Gen Virol* **82**:1621-7.
209. **Kingdon, J.** 1997. The kingdon field guide to African mammals. Academic Press, San Diego, CA.
210. **Kinter, A., and A. S. Fauci.** 1996. Interleukin-2 and human immunodeficiency virus infection: pathogenic mechanisms and potential for immunologic enhancement. *Immunol Res* **15**:1-15.
211. **Koblavi-Deme, S., C. Maurice, D. Yavo, T. S. Sibailly, K. N'Guessan, Y. Kamelan-Tano, S. Z. Wiktor, T. H. Roels, T. Chorba, and J. N. Nkengasong.** 2001. Sensitivity and specificity of human immunodeficiency virus rapid serologic assays and testing algorithms in an antenatal clinic in Abidjan, Ivory Coast. *J Clin Microbiol* **39**:1808-12.
212. **Kodama, T., D. P. Silva, M. D. Daniel, J. E. Phillips-Conroy, C. J. Jolly, J. Rogers, and R. C. Desrosiers.** 1989. Prevalence of antibodies to SIV in baboons in their native habitat. *AIDS Res Hum Retroviruses* **5**:337-43.
213. **Kohl, N. E., E. A. Emini, W. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. A. Dixon, E. M. Scolnick, and I. S. Sigal.** 1988. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:4686-90.
214. **Kuiken, C. L., G. Zwart, E. Baan, R. A. Coutinho, J. A. van den Hoek, and J. Goudsmit.** 1993. Increasing antigenic and genetic diversity of the V3 variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in the course of the AIDS epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9061-5.
215. **Kulkarni, S., M. Thakar, J. Rodrigues, and K. Banerjee.** 1992. HIV-2 antibodies in serum samples from Maharashtra state. *Indian J Med Res* **95**:213-5.

216. **Kuritzkes, D. R., J. Jacobson, W. G. Powderly, E. Godofsky, E. DeJesus, F. Haas, K. A. Reimann, J. L. Larson, P. O. Yarbough, V. Curt, and W. R. Shanahan, Jr.** 2004. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis* **189**:286-91.
217. **LaFemina, R. L., C. L. Schneider, H. L. Robbins, P. L. Callahan, K. LeGrow, E. Roth, W. A. Schleif, and E. A. Emini.** 1992. Requirement of active human immunodeficiency virus type 1 integrase enzyme for productive infection of human T-lymphoid cells. *J Virol* **66**:7414-9.
218. **Lalezari, J. P., K. Henry, M. O'Hearn, J. S. Montaner, P. J. Piliero, B. Trottier, S. Walmsley, C. Cohen, D. R. Kuritzkes, J. J. Eron, Jr., J. Chung, R. DeMasi, L. Donatucci, C. Drobnes, J. Delehanty, and M. Salgo.** 2003. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med* **348**:2175-85.
219. **Laukkanen, T., J. Albert, K. Liitsola, S. D. Green, J. K. Carr, T. Leitner, F. E. McCutchan, and M. O. Salminen.** 1999. Virtually full-length sequences of HIV type 1 subtype J reference strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**:293-7.
220. **Laurent, C., A. Bourgeois, M. A. Faye, R. Mougnotou, M. Seydi, M. Gueye, F. Liegeois, C. T. Kane, C. Butel, J. Mbuagbaw, L. Zekeng, S. Mboup, E. Mpoudi-Ngole, M. Peeters, and E. Delaporte.** 2002. No difference in clinical progression between patients infected with the predominant human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form (CRF) 02_AG strain and patients not infected with CRF02_AG, in Western and West-Central Africa: a four-year prospective multicenter study. *J Infect Dis* **186**:486-92.
221. **Laurent, C., A. Bourgeois, M. Mpoudi, C. Butel, M. Peeters, E. Mpoudi-Ngole, and E. Delaporte.** 2004. Commercial logging and HIV epidemic, rural Equatorial Africa. *Emerg Infect Dis* **10**:1953-6.
222. **Laurent, C., C. Kouanfack, S. Koulla-Shiro, N. Nkoue, A. Bourgeois, A. Calmy, B. Lactuock, V. Nzeusseu, R. Mougnotou, G. Peytavin, F. Liegeois, E. Nerrienet, M. Tardy, M. Peeters, I. Andrieux-Meyer, L. Zekeng, M. Kazatchkine, E. Mpoudi-Ngole, and E. Delaporte.** 2004. Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1-infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. *Lancet* **364**:29-34.
223. **Lazzarin, A., B. Clotet, D. Cooper, J. Reynes, K. Arasteh, M. Nelson, C. Katlama, H. J. Stellbrink, J. F. Delfraissy, J. Lange, L. Huson, R. DeMasi, C. Wat, J. Delehanty, C. Drobnes, and M. Salgo.** 2003. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* **348**:2186-95.
224. **Leano, P. S., S. Kageyama, A. Espantaleon, J. Maniar, M. Iwasaki, D. Saple, N. Yoshihara, T. Kurimura, and D. M. Agdamag.** 2003. Introduction of human immunodeficiency virus type 2 infection in the Philippines. *J Clin Microbiol* **41**:516-8.

225. **Lemey, P., O. G. Pybus, A. Rambaut, A. J. Drummond, D. L. Robertson, P. Roques, M. Worobey, and A. M. Vandamme.** 2004. The molecular population genetics of HIV-1 group O. *Genetics* **167**:1059-68.
226. **Lemey, P., O. G. Pybus, B. Wang, N. K. Saksena, M. Salemi, and A. M. Vandamme.** 2003. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6588-92.
227. **Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, and L. S. Oshiro.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**:840-2.
228. **Levy, Y., and B. Autran.** 2004. Immunothérapie non spécifique et spécifique de l'infection par le VIH, p. 531-545. *In* P.-M. Girard, C. Katlama, and G. Pialoux (ed.), VIH Edition 2004. Doin, Paris.
229. **Li, Y., Y. M. Naidu, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers.** 1989. Extensive genetic variability of simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *J Virol* **63**:1800-2.
230. **Liegeois, F., V. Courgnaud, W. M. Switzer, W. M. Murphy, S. Loul, A. F. Aghokeng, X. Pourrut, E. Mpoudi, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2006. Molecular characterization of a novel simian immunodeficiency virus lineage (SIVtal) from Northern Talapoins (*Miopithecus ogouensis*). *Virology* (*in press*)
231. **Ling, B., C. Apetrei, I. Pandrea, R. S. Veazey, A. A. Lackner, B. Gormus, and P. A. Marx.** 2004. Classic AIDS in a sooty mangabey after an 18-year natural infection. *J Virol* **78**:8902-8.
232. **Ling, B., M. L. Santiago, S. Meleth, B. Gormus, H. M. McClure, C. Apetrei, B. H. Hahn, and P. A. Marx.** 2003. Noninvasive detection of new simian immunodeficiency virus lineages in captive sooty mangabeys: ability to amplify virion RNA from fecal samples correlates with viral load in plasma. *J Virol* **77**:2214-26.
233. **Loemba, H., B. Brenner, M. A. Parniak, S. Ma'ayan, B. Spira, D. Moisi, M. Oliveira, M. Detorio, and M. A. Wainberg.** 2002. Genetic divergence of human immunodeficiency virus type 1 Ethiopian clade C reverse transcriptase (RT) and rapid development of resistance against nonnucleoside inhibitors of RT. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2087-94.
234. **Lole, K. S., R. C. Bollinger, R. S. Paranjape, D. Gadkari, S. S. Kulkarni, N. G. Novak, R. Ingersoll, H. W. Sheppard, and S. C. Ray.** 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* **73**:152-60.
235. **Los Alamos National Laboratory** 2005, posting date. The Circulating Recombinant Forms (CRFs). Available at: <http://www.hiv.lanl.gov/>.

236. **Los Alamos National Laboratory** 2003, posting date. HIV sequence database. Available at: <http://www.hiv.lanl.gov/>.
237. **Loussert-Ajaka, I., M. L. Chaix, B. Korber, F. Letourneur, E. Gomas, E. Allen, T. D. Ly, F. Brun-Vezinet, F. Simon, and S. Saragosti.** 1995. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol* **69**:5640-9.
238. **Loussert-Ajaka, I., T. D. Ly, M. L. Chaix, D. Ingrand, S. Saragosti, A. M. Courouce, F. Brun-Vezinet, and F. Simon.** 1994. HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet* **343**:1393-4.
239. **Louwagie, J., F. McCutchan, M. Peeters, and e. al.** 1993. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* **7**:769-780.
240. **Lowenstine, L. J., N. C. Pedersen, J. Higgins, K. C. Pallis, A. Uyeda, P. Marx, N. W. Lerche, R. J. Munn, and M. B. Gardner.** 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**:563-74.
241. **Lwoff, A.** 1957. The concept of virus. *Journal of General microbiology* **17**:239-253.
242. **Ly, T. D., L. Martin, D. Daghfal, A. Sandridge, D. West, R. Bristow, L. Chalouas, X. Qiu, S. C. Lou, J. C. Hunt, G. Schochetman, and S. G. Devare.** 2001. Seven human immunodeficiency virus (HIV) antigen-antibody combination assays: evaluation of HIV seroconversion sensitivity and subtype detection. *J Clin Microbiol* **39**:3122-8.
243. **Machuca, A., V. Soriano, M. Gutierrez, A. Holguin, A. Aguilera, E. Caballero, and G. Cilla.** 1999. Human immunodeficiency virus type 2 infection in Spain. The HIV-2 Spanish Study Group. *Intervirology* **42**:37-42.
244. **Mahieux, R., C. Chappay, M. C. Georges-Courbot, G. Dubreuil, P. Mauclore, A. Georges, and A. Gessain.** 1998. Simian T-cell lymphotropic virus type 1 from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type 1 subtype D. *J Virol* **72**:10316-22.
245. **Makuwa, M., S. Souquiere, M. T. Niangui, P. Rouquet, C. Apetrei, P. Roques, and F. Simon.** 2002. Reliability of rapid diagnostic tests for HIV variant infection. *J Virol Methods* **103**:183-90.
246. **Malim, M. H., and B. R. Cullen.** 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol Cell Biol* **13**:6180-9.

247. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-7.
248. **Mamadou, S., C. Montavon, A. Ben, A. Djibo, S. Rabiou, S. Mboup, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2002. Predominance of CRF02-AG and CRF06-cpx in Niger, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:723-6.
249. **Mansky, L. M., and H. M. Temin.** 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**:5087-94.
250. **Margottin, F., S. P. Bour, H. Durand, L. Selig, S. Benichou, V. Richard, D. Thomas, K. Strebel, and R. Benarous.** 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* **1**:565-74.
251. **Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, and D. Kabat.** 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**:1398-403.
252. **Marlink, R., P. Kanki, I. Thior, K. Travers, G. Eisen, T. Siby, I. Traore, C. C. Hsieh, M. C. Dia, E. H. Gueye, et al.** 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* **265**:1587-90.
253. **Marx, P. A., Y. Li, N. W. Lerche, S. Sutjipto, A. Gettie, J. A. Yee, B. H. Brotman, A. M. Prince, A. Hanson, R. G. Webster, et al.** 1991. Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a west African pet sooty mangabey. *J Virol* **65**:4480-5.
254. **Masciotra, S., D. L. Rudolph, G. van der Groen, C. Yang, and R. B. Lal.** 2000. Serological detection of infection with diverse human and simian immunodeficiency viruses using consensus env peptides. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**:706-9.
255. **Mauclere, P., F. Damond, C. Apetrei, I. Loussert-Ajaka, S. Souquiere, L. Buzelay, P. Dalbon, M. Jolivet, M. Mony Lobe, F. Brun-Vezinet, F. Simon, and F. Barin.** 1997. Synthetic peptide ELISAs for detection of and discrimination between group M and group O HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:987-93.
256. **Mauclere, P., I. Loussert-Ajaka, F. Damond, P. Fagot, S. Souquieres, M. Monny Lobe, F. X. Mbopi Keou, F. Barre-Sinoussi, S. Saragosti, F. Brun-Vezinet, and F. Simon.** 1997. Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *Aids* **11**:445-53.
257. **Mboudjeka, I., B. Bikandou, L. Zekeng, J. Takehisa, Y. Harada, Y. Yamaguchi-Kabata, Y. Taniguchi, E. Ido, L. Kaptue, P. M'Pelle, H. J. Parra, M. Ikeda, M. Hayami, and T. Miura.** 1999. Genetic diversity of HIV-1 group M from Cameroon and Republic of Congo. *Arch Virol* **144**:2291-311.

258. **Mboudjeka, I., L. Zekeng, J. Takehisa, T. Miura, E. Ido, M. Yamashita, L. Kaptue, and M. Hayami.** 1999. HIV type 1 genetic variability in the northern part of Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**:951-6.
259. **McCutchan, F. E.** 2000. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *Aids* **14 Suppl 3**:S31-44.
260. **McElrath, M. J., L. Corey, D. Montefiori, M. Wolff, D. Schwartz, M. Keefer, R. Belshe, B. S. Graham, T. Matthews, P. Wright, G. Gorse, R. Dolin, P. Berman, D. Francis, A. M. Duliege, D. Bolognesi, D. Stablein, N. Ketter, and P. Fast.** 2000. A phase II study of two HIV type 1 envelope vaccines, comparing their immunogenicity in populations at risk for acquiring HIV type 1 infection. AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:907-19.
261. **McMichael, A., and T. Hanke.** 2002. The quest for an AIDS vaccine: is the CD8+ T-cell approach feasible? *Nat Rev Immunol* **2**:283-91.
262. **Mellors, J. W., C. R. Rinaldo, Jr., P. Gupta, R. M. White, J. A. Todd, and L. A. Kingsley.** 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**:1167-70.
263. **Meloni, S. T., B. Kim, J. L. Sankale, D. J. Hamel, S. Tovanabutra, S. Mboup, F. E. McCutchan, and P. J. Kanki.** 2004. Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol* **78**:12438-45.
264. **Meloni, S. T., J. L. Sankale, D. J. Hamel, G. Eisen, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, and P. J. Kanki.** 2004. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A3 in Senegal from 1988 to 2001. *J Virol* **78**:12455-61.
265. **Michel, P., A. T. Balde, C. Roussillon, G. Aribot, J. L. Sarthou, and M. L. Gougeon.** 2000. Reduced immune activation and T cell apoptosis in human immunodeficiency virus type 2 compared with type 1: correlation of T cell apoptosis with beta2 microglobulin concentration and disease evolution. *J Infect Dis* **181**:64-75.
266. **Miguel, E., M. E. Quinones-Mateu, and E. J. Arts.** 1999. Recombination in HIV-1: Update and Implications. *AIDS Rev* **1**:89-100.
267. **Mitani, J. C., and D. P. Watts.** 1999. Demographic influences on the hunting behavior of chimpanzees. *Am J Phys Anthropol* **109**:439-54.
268. **Montavon, C., C. Toure-Kane, J. N. Nkengasong, L. Vergne, K. Hertogs, S. Mboup, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2002. CRF06-cpx: a new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving subtypes A, G, K, and J. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**:522-30.
269. **Montavon, C., L. Vergne, A. Bourgeois, E. Mpoudi-Ngole, G. Malonga-Mouellet, C. Butel, C. Toure-Kane, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2002. Identification of a new

- circulating recombinant form of HIV type 1, CRF11-cpx, involving subtypes A, G, J, and CRF01-AE, in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:231-6.
270. **Morin, P. A., J. J. Moore, R. Chakraborty, L. Jin, J. Goodall, and D. S. Woodruff.** 1994. Kin selection, social structure, gene flow, and the evolution of chimpanzees. *Science* **265**:1193-201.
271. **Morris, L., C. Pillay, C. Chezzi, P. Lupondwana, M. Ntsala, L. Levin, F. Venter, N. Martinson, G. Gray, and J. McIntyre.** 2003. Low frequency of the V106M mutation among HIV-1 subtype C-infected pregnant women exposed to nevirapine. *Aids* **17**:1698-700.
272. **Muller, M. C., N. K. Saksena, E. Nerrienet, C. Chappey, V. M. Herve, J. P. Durand, P. Legal-Campodonico, M. C. Lang, J. P. Digoutte, A. J. Georges, et al.** 1993. Simian immunodeficiency viruses from central and western Africa: evidence for a new species-specific lentivirus in tanzania monkeys. *J Virol* **67**:1227-35.
273. **Muller-Trutwin, M. C., S. Corbet, S. Souquiere, P. Roques, P. Versmisse, A. Ayoub, S. Delarue, E. Nerrienet, J. Lewis, P. Martin, F. Simon, F. Barre-Sinoussi, and P. Maucclere.** 2000. SIVcpz from a naturally infected Cameroonian chimpanzee: biological and genetic comparison with HIV-1 N. *J Med Primatol* **29**:166-72.
274. **Mullins, J. I., D. C. Nickle, L. Heath, A. G. Rodrigo, and G. H. Learn.** 2004. Immunogen sequence: the fourth tier of AIDS vaccine design. *Expert Rev Vaccines* **3**:S151-9.
275. **Murphey-Corb, M., L. N. Martin, S. R. Rangan, G. B. Baskin, B. J. Gormus, R. H. Wolf, W. A. Andes, M. West, and R. C. Montelaro.** 1986. Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys. *Nature* **321**:435-7.
276. **Muthumani, K., S. Kudchodkar, D. Zhang, M. L. Bagarazzi, J. J. Kim, J. D. Boyer, V. Ayyavoo, G. N. Pavlakis, and D. B. Weiner.** 2002. Issues for improving multiplasmid DNA vaccines for HIV-1. *Vaccine* **20**:1999-2003.
277. **Nakashima, H., T. Matsui, S. Harada, N. Kobayashi, A. Matsuda, T. Ueda, and N. Yamamoto.** 1986. Inhibition of replication and cytopathic effect of human T cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus by 3'-azido-3'-deoxythymidine in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **30**:933-7.
278. **Ndembi, N., J. Takehisa, L. Zekeng, E. Kobayashi, C. Ngansop, E. M. Songok, S. Kageyama, T. Takemura, E. Ido, M. Hayami, L. Kaptue, and H. Ichimura.** 2004. Genetic diversity of HIV type 1 in rural eastern Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* **37**:1641-50.
279. **Ndongmo, C. B., W. M. Switzer, C. P. Pau, C. Zeh, A. Schaefer, D. Pieniazek, T. M. Folks, and M. L. Kalish.** 2004. New multiple antigenic peptide-based enzyme

- immunoassay for detection of simian immunodeficiency virus infection in nonhuman primates and humans. *J Clin Microbiol* **42**:5161-9.
280. **Nerrienet, E., C. Apetrei, Y. Foupouapouognigni, B. Ling, A. Luckay, L. Chakrabarti, A. Ayouba, and P. Marx.** New primate lentivirus from agile monkeys (*Cercocebus agilis*) suggests a host-dependant evolution within mangabeys in Central Africa. *Presented at the XIV International AIDS Conference. Abstr. TuPeA4405*, Barcelona 2002.
281. **Nerrienet, E., M. L. Santiago, Y. Foupouapouognigni, E. Bailes, N. I. Mundy, B. Njinku, A. Kfutwah, M. C. Muller-Trutwin, F. Barre-Sinoussi, G. M. Shaw, P. M. Sharp, B. H. Hahn, and A. Ayouba.** 2005. Simian immunodeficiency virus infection in wild-caught chimpanzees from cameroon. *J Virol* **79**:1312-9.
282. **Nicol, L., D. Messinger, P. Dubouch, J. Bernard, I. Desportes, R. Jouffre, R. Snart, P. Nara, R. C. Gallo, and D. Zagury.** 1989. Use of Old World monkeys for acquired immunodeficiency syndrome research. *J Med Primatol* **18**:227-36.
283. **Nkengasong, J. N., L. Kestens, P. D. Ghys, S. Koblavi-Deme, R. A. Otten, C. Bile, C. Maurice, M. Kalou, M. Laga, S. Z. Wiktor, and A. E. Greenberg.** 2000. Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 and type 2: impact on HIV type 1 viral load and immune activation markers in HIV-seropositive female sex workers in Abidjan, Ivory Coast. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:1371-8.
284. **Nkengasong, J. N., C. Maurice, S. Koblavi, M. Kalou, D. Yavo, M. Maran, C. Bile, K. N'Guessan, J. Kouadio, S. Bony, S. Z. Wiktor, and A. E. Greenberg.** 1999. Evaluation of HIV serial and parallel serologic testing algorithms in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Aids* **13**:109-17.
285. **Novembre, F. J., J. de Rosayro, S. Nidtha, S. P. O'Neil, T. R. Gibson, T. Evans-Strickfaden, C. E. Hart, and H. M. McClure.** 2001. Rapid CD4(+) T-cell loss induced by human immunodeficiency virus type 1(NC) in uninfected and previously infected chimpanzees. *J Virol* **75**:1533-9.
286. **Novitsky, V. A., M. A. Montano, M. F. McLane, B. Renjifo, F. Vannberg, B. T. Foley, T. P. Ndung'u, M. Rahman, M. J. Makhema, R. Marlink, and M. Essex.** 1999. Molecular cloning and phylogenetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C: a set of 23 full-length clones from Botswana. *J Virol* **73**:4427-32.
287. **Nyambi, P., L. Heyndrickx, K. Vereecken, S. Burda, K. De Houwer, S. Coppens, M. Urbanski, C. Williams, P. Ndumbe, and W. Janssens.** 2002. Predominance of infection with HIV-1 circulating recombinant form CRF02_AG in major Cameroonian cities and towns. *Aids* **16**:295-6.
288. **Nyambi, P., L. Zekeng, H. Kenfack, M. Tongo, A. Nanfack, I. Nkombe, F. Ndonko, J. Shang, S. Burda, H. Mbah, L. Agyingi, P. Zhong, A. Nadas, S. Zolla-Pazner, and**

- M. Marmor.** 2002. HIV infection in rural villages of Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* **31**:506-13.
289. **O'Neil, S. P., F. J. Novembre, A. B. Hill, C. Suwyn, C. E. Hart, T. Evans-Strickfaden, D. C. Anderson, J. deRosayro, J. G. Herndon, M. Saucier, and H. M. McClure.** 2000. Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees. *J Infect Dis* **182**:1051-62.
290. **Ohagen, A., and D. Gabuzda.** 2000. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* **74**:11055-66.
291. **Ohta, Y., T. Masuda, H. Tsujimoto, K. Ishikawa, T. Kodama, S. Morikawa, M. Nakai, S. Honjo, and M. Hayami.** 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**:115-22.
292. **ONUSIDA.** 2005. Le point sur l'épidémie de SIDA. ONUSIDA/Organisation mondiale de la Santé. Available at: <http://www.unaids.org.in/>.
293. **ONUSIDA.** 2004. Rapport 2004 sur l'épidémie mondiale de SIDA. ONUSIDA/Organisation mondiale de la Santé. Available at: <http://www.unaids.org.in/>.
294. **Ortiz, M., I. Sanchez, M. P. Gonzalez, M. I. Leon, N. Abeso, E. Asumu, and A. Garcia-Saiz.** 2001. Molecular epidemiology of HIV type 1 subtypes in equatorial guinea. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:851-5.
295. **Osterhaus, A. D., N. Pedersen, G. van Amerongen, M. T. Frankenhuis, M. Marthas, E. Reay, T. M. Rose, J. Pamungkas, and M. L. Bosch.** 1999. Isolation and partial characterization of a lentivirus from talapoin monkeys (*Miopithecus talapoin*). *Virology* **260**:116-24.
296. **Otero, G. C., M. E. Harris, J. E. Donello, and T. J. Hope.** 1998. Leptomycin B inhibits equine infectious anemia virus Rev and feline immunodeficiency virus rev function but not the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *J Virol* **72**:7593-7.
297. **Page, S. L., C. Chiu, and M. Goodman.** 1999. Molecular phylogeny of Old World monkeys (*Cercopithecidae*) as inferred from gamma-globin DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* **13**:348-59.
298. **Pandrea, I., R. Onanga, P. Rouquet, O. Bourry, P. Ngari, E. J. Wickings, P. Roques, and C. Apetrei.** 2001. Chronic SIV infection ultimately causes immunodeficiency in African non-human primates. *Aids* **15**:2461-2.
299. **Parkin, N., C. Chappey, L. Maroldo, M. Bates, N. S. Hellmann, and C. J. Petropoulos.** 2002. Phenotypic and genotypic HIV-1 drug resistance assays provide complementary information. *J Acquir Immune Defic Syndr* **31**:128-36.

300. **Paul, M., and M. A. Jabbar.** 1997. Phosphorylation of both phosphoacceptor sites in the HIV-1 Vpu cytoplasmic domain is essential for Vpu-mediated ER degradation of CD4. *Virology* **232**:207-16.
301. **Pauwels, R., K. Andries, J. Desmyter, D. Schols, M. J. Kukla, H. J. Breslin, A. Raeymaeckers, J. Van Gelder, R. Woestenborghs, J. Heykants, et al.** 1990. Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. *Nature* **343**:470-4.
302. **Peeters, M.** 2000. Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic, p. I-39-54. *In* C. L. Kuiken, B. T. Foley, B. Hahn, B. T. Korber, F. McCutchan, P. A. Marx, J. W. Mellors, J. I. Mullins, J. Sodroski, and S. Wolinsky (ed.), *The HIV sequence compedium 2000*. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.
303. **Peeters, M., and V. Courgnaud.** 2002. Overview of primate lentiviruses and the evolution of non-human primates in Africa., p. 2-23. *In* C. Kuiken, B. Foley, E. Freed, B. Hahn, B. Korber, P. Marx, F. McCutchan, J. W. Mellors, and S. Wolinsky (ed.), *HIV Sequence Compendium 2002*. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.M.
304. **Peeters, M., V. Courgnaud, B. Abela, P. Auzel, X. Pourrut, F. Bibollet-Ruche, S. Loul, F. Liegeois, C. Butel, D. Koulagna, E. Mpoudi-Ngole, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and E. Delaporte.** 2002. Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerg Infect Dis* **8**:451-7.
305. **Peeters, M., K. Fransen, E. Delaporte, M. Van den Haesevelde, G. M. Gershy-Damet, L. Kestens, G. van der Groen, and P. Piot.** 1992. Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate cpz-ant) from a wild-captured chimpanzee. *Aids* **6**:447-51.
306. **Peeters, M., A. Gueye, S. Mboup, F. Bibollet-Ruche, E. Ekaza, C. Mulanga, R. Ouedrago, R. Gandji, P. Mpele, G. Dibanga, B. Koumare, M. Saidou, E. Esu-Williams, J. P. Lombart, W. Badombena, N. Luo, M. Vanden Haesevelde, and E. Delaporte.** 1997. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *Aids* **11**:493-8.
307. **Peeters, M., C. Honore, T. Huet, L. Bedjabaga, S. Ossari, P. Bussi, R. W. Cooper, and E. Delaporte.** 1989. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *Aids* **3**:625-30.
308. **Peeters, M., W. Janssens, K. Fransen, J. Brandful, L. Heyndrickx, K. Koffi, E. Delaporte, P. Piot, G. M. Gershy-Damet, and G. van der Groen.** 1994. Isolation of simian immunodeficiency viruses from two sooty mangabeys in Cote d'Ivoire: virological and genetic characterization and relationship to other HIV type 2 and SIVsm/mac strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:1289-94.

309. **Peeters, M., F. Liegeois, N. Torimiro, A. Bourgeois, E. Mpoudi, L. Vergne, E. Saman, E. Delaporte, and S. Saragosti.** 1999. Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virol* **73**:7368-75.
310. **Peeters, M., and P. M. Sharp.** 2000. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *Aids* **14 Suppl 3**:S129-40.
311. **Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard, and D. D. Ho.** 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**:1582-6.
312. **Phillips-Conroy, J. E., C. J. Jolly, B. Petros, J. S. Allan, and R. C. Desrosiers.** 1994. Sexual transmission of SIVagm in wild grivet monkeys. *J Med Primatol* **23**:1-7.
313. **Pialoux, G., H. Gahery-Segard, S. Sermet, H. Poncelet, S. Fournier, L. Gerard, A. Tartar, H. Gras-Masse, J. P. Levy, and J. G. Guillet.** 2001. Lipopeptides induce cell-mediated anti-HIV immune responses in seronegative volunteers. *Aids* **15**:1239-49.
314. **Pieniazek, D., D. Ellenberger, L. M. Janini, A. C. Ramos, J. Nkengasong, M. Sassan-Morokro, D. J. Hu, I. M. Coulibally, E. Ekpini, C. Bandea, A. Tanuri, A. E. Greenberg, S. Z. Wiktor, and M. A. Rayfield.** 1999. Predominance of human immunodeficiency virus type 2 subtype B in Abidjan, Ivory Coast. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**:603-8.
315. **Pieniazek, D., M. Rayfield, D. J. Hu, J. Nkengasong, S. Z. Wiktor, R. Downing, B. Biryahwaho, T. Mastro, A. Tanuri, V. Soriano, R. Lal, and T. Dondero.** 2000. Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naive individuals worldwide. HIV Variant Working Group. *Aids* **14**:1489-95.
316. **Popper, S. J., A. D. Sarr, K. U. Travers, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, M. E. Essex, and P. J. Kanki.** 1999. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* **180**:1116-21.
317. **Preston, B. D., B. J. Poiesz, and L. A. Loeb.** 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**:1168-71.
318. **Prince, A. M., B. Brotman, D. H. Lee, L. Andrus, J. Valinsky, and P. Marx.** 2002. Lack of evidence for HIV type 1-related SIVcpz infection in captive and wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) in West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:657-60.
319. **Quinones-Mateu, M. E., J. L. Albright, A. Mas, V. Soriano, and E. J. Arts.** 1998. Analysis of pol gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**:9002-15.

320. **Quinones-Mateu, M. E., Y. Gao, S. C. Ball, A. J. Marozsan, A. Abraha, and E. J. Arts.** 2002. In vitro intersubtype recombinants of human immunodeficiency virus type 1: comparison to recent and circulating in vivo recombinant forms. *J Virol* **76**:9600-13.
321. **Range, F., and R. Noe.** 2002. Familiarity and dominance relations among female sooty mangabeys in the Tai National Park. *Am J Primatol* **56**:137-53.
322. **Ratnasabapathy, R., M. Sheldon, L. Johal, and N. Hernandez.** 1990. The HIV-1 long terminal repeat contains an unusual element that induces the synthesis of short RNAs from various mRNA and snRNA promoters. *Genes Dev* **4**:2061-74.
323. **Ratner, L., R. C. Gallo, and F. Wong-Staal.** 1985. HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* **313**:636-7.
324. **Reed, P., S. Souquiere, M. Makuwa, P. Telfer, M. A. Ela-Mba, B. P. Roques, and P. Marx.** 2003. Preliminary sequence data for SIVs from *C. erythrotis*. *2nd IAS Conf. HIV Pathog. Treatment, abstr. 224*. Paris 2003.
325. **Reeves, J. D., and R. W. Doms.** 2002. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* **83**:1253-65.
326. **Rehle, T. M., P. Mattke, G. N. Liomba, S. Kramer, G. M. Gershy-Damet, K. Konan, A. Sangare, L. Zekeng, J. M. Tsague, L. Kaptue, J. Eberle, and L. Gurtler.** 1997. Evaluation of a quantitative double ELISA strategy for confirmation and differentiation of HIV infection. *J Virol Methods* **66**:203-9.
327. **Renjifo, B., B. Chaplin, D. Mwakagile, P. Shah, F. Vannberg, G. Msamanga, D. Hunter, W. Fawzi, and M. Essex.** 1998. Epidemic expansion of HIV type 1 subtype C and recombinant genotypes in Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:635-8.
328. **Renjifo, B., W. Fawzi, D. Mwakagile, D. Hunter, G. Msamanga, D. Spiegelman, M. Garland, C. Kagoma, A. Kim, B. Chaplin, E. Hertzmark, and M. Essex.** 2001. Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol* **4**:16-25.
329. **Rhee, S. Y., M. J. Gonzales, R. Kantor, B. J. Betts, J. Ravela, and R. W. Shafer.** 2003. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* **31**:298-303.
330. **Rimsky, L. T., D. C. Shugars, and T. J. Matthews.** 1998. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol* **72**:986-93.
331. **Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel.** 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171-3.

332. **Robertson, D. L., J. P. Anderson, J. A. Bradac, J. K. Carr, B. Foley, R. K. Funkhouser, F. Gao, B. H. Hahn, M. L. Kalish, C. Kuiken, G. H. Learn, T. Leitner, F. McCutchan, S. Osmanov, M. Peeters, D. Pieniazek, M. Salminen, P. M. Sharp, S. Wolinsky, and B. Korber.** 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**:55-6.
333. **Robertson, D. L., J. P. Anderson, J. A. Bradac, J. K. Carr, B. Foley, R. K. Funkhouser, F. Gao, B. H. Hahn, C. Kuiken, G. H. Learn, T. Leitner, F. McCutchan, S. Osmanov, M. Peeters, D. Pieniazek, M. L. Kalish, M. Salminen, P. M. Sharp, S. Wolinsky, and B. Korber.** 1999. HIV-1 Nomenclature Proposal, p. 495-505. In C. L. Kuiken, B. T. Foley, B. Hahn, P. A. Marx, F. McCutchan, J. W. Mellors, J. I. Mullins, S. Wolinsky, and B. Korber (ed.), *Human Retroviruses and AIDS 1999*. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.
334. **Robertson, D. L., P. M. Sharp, F. E. McCutchan, and B. H. Hahn.** 1995. Recombination in HIV-1. *Nature* **374**:124-6.
335. **Roman, F., D. Gonzalez, C. Lambert, S. Deroo, A. Fischer, T. Baurith, T. Staub, R. Boulme, V. Arendt, F. Schneider, R. Hemmer, and J. C. Schmit.** 2003. Uncommon mutations at residue positions critical for enfuvirtide (T-20) resistance in enfuvirtide-naïve patients infected with subtype B and non-B HIV-1 strains. *J Acquir Immune Defic Syndr* **33**:134-9.
336. **Roques, P., D. L. Robertson, S. Souquiere, C. Apetrei, E. Nerrienet, F. Barre-Sinoussi, M. Muller-Trutwin, and F. Simon.** 2004. Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *Aids* **18**:1371-81.
337. **Roques, P., D. L. Robertson, S. Souquiere, F. Damond, A. Ayouba, I. Farfara, C. Depienne, E. Nerrienet, D. Dormont, F. Brun-Vezinet, F. Simon, and P. Maucelere.** 2002. Phylogenetic analysis of 49 newly derived HIV-1 group O strains: high viral diversity but no group M-like subtype structure. *Virology* **302**:259-73.
338. **Rubsamen-Waigmann, H., J. Maniar, S. Gerte, H. D. Brede, U. Dietrich, G. Mahambre, and A. Pfutzner.** 1994. High proportion of HIV-2 and HIV-1/2 double-reactive sera in two Indian states, Maharashtra and Goa: first appearance of an HIV-2 epidemic along with an HIV-1 epidemic outside of Africa. *Zentralbl Bakteriol* **280**:398-402.
339. **Saah, A. J., H. Farzadegan, R. Fox, P. Nishanian, C. R. Rinaldo, Jr., J. P. Phair, J. L. Fahey, T. H. Lee, and B. F. Polk.** 1987. Detection of early antibodies in human immunodeficiency virus infection by enzyme-linked immunosorbent assay, Western blot, and radioimmunoprecipitation. *J Clin Microbiol* **25**:1605-10.
340. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**:406-25.

341. Sakai, H., M. Kawamura, J. Sakuragi, S. Sakuragi, R. Shibata, A. Ishimoto, N. Ono, S. Ueda, and A. Adachi. 1993. Integration is essential for efficient gene expression of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**:1169-74.
342. Samson, M., F. Libert, B. J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C. M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, R. W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**:722-5.
343. Santiago, M. L., F. Bibollet-Ruche, E. Bailes, S. Kamenya, M. N. Muller, M. Lukasik, A. E. Pusey, D. A. Collins, R. W. Wrangham, J. Goodall, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 2003. Amplification of a complete simian immunodeficiency virus genome from fecal RNA of a wild chimpanzee. *J Virol* **77**:2233-42.
344. Santiago, M. L., F. Bibollet-Ruche, N. Gross-Camp, A. C. Majewski, M. Masozera, I. Munanura, B. A. Kaplin, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn. 2003. Noninvasive detection of Simian immunodeficiency virus infection in a wild-living L'Hoest's monkey (*Cercopithecus lhoesti*). *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:1163-6.
345. Santiago, M. L., M. Lukasik, S. Kamenya, Y. Li, F. Bibollet-Ruche, E. Bailes, M. N. Muller, M. Emery, D. A. Goldenberg, J. S. Lwanga, A. Ayouba, E. Nerrienet, H. M. McClure, J. L. Heeney, D. P. Watts, A. E. Pusey, D. A. Collins, R. W. Wrangham, J. Goodall, J. F. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn. 2003. Foci of endemic simian immunodeficiency virus infection in wild-living eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *J Virol* **77**:7545-62.
346. Santiago, M. L., F. Range, B. F. Keele, Y. Li, E. Bailes, F. Bibollet-Ruche, C. Fruteau, R. Noe, M. Peeters, J. F. Brookfield, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 2005. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* **79**:12515-27.
347. Santiago, M. L., C. M. Rodenburg, S. Kamenya, F. Bibollet-Ruche, F. Gao, E. Bailes, S. Meleth, S. J. Soong, J. M. Kilby, Z. Moldoveanu, B. Fahey, M. N. Muller, A. Ayouba, E. Nerrienet, H. M. McClure, J. L. Heeney, A. E. Pusey, D. A. Collins, C. Boesch, R. W. Wrangham, J. Goodall, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn. 2002. SIVcpz in wild chimpanzees. *Science* **295**:465.
348. Sarngadharan, M. G., A. L. DeVico, L. Bruch, J. Schupbach, and R. C. Gallo. 1984. HTLV-III: the etiologic agent of AIDS. *Princess Takamatsu Symp* **15**:301-8.
349. Saville, R. D., N. T. Constantine, F. R. Cleghorn, N. Jack, C. Bartholomew, J. Edwards, P. Gomez, and W. A. Blattner. 2001. Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody. *J Clin Microbiol* **39**:2518-24.

350. **Schable, C., L. Zekeng, C. P. Pau, D. Hu, L. Kaptue, L. Gurtler, T. Dondero, J. M. Tsague, G. Schochetman, H. Jaffe, et al.** 1994. Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group O infections. *Lancet* **344**:1333-4.
351. **Schim van der Loeff, M. F., and P. Aaby.** 1999. Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *Aids* **13 Suppl A**:S69-84.
352. **Schindler, M., S. Wurfl, P. Benaroch, T. C. Greenough, R. Daniels, P. Easterbrook, M. Brenner, J. Munch, and F. Kirchhoff.** 2003. Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J Virol* **77**:10548-56.
353. **Schols, D., and E. De Clercq.** 1998. The simian immunodeficiency virus mnd(GB-1) strain uses CXCR4, not CCR5, as coreceptor for entry in human cells. *J Gen Virol* **79** (Pt 9):2203-5.
354. **Schurmann, D., R. Rouzier, R. Nougarede, J. Reynes, and e. al.** SCH D: Antiviral activity of a CCR5 receptor antagonist. *Presented at the 11th Conf. Retrovir. Opportun. Infect. Abstr. 140LB.* San Francisco 2004.
355. **Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J. M. Heard.** 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**:338-42.
356. **Shafer, R. W.** 2002. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **15**:247-77.
357. **Shafer, R. W.** 2003, posting date. Stanford HIV RT and protease sequence database. Available at: http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivalg.
358. **Sharp, P. M., E. Bailes, R. R. Chaudhuri, C. M. Rodenburg, M. O. Santiago, and B. H. Hahn.** 2001. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**:867-76.
359. **Sharp, P. M., E. Bailes, F. Gao, B. E. Beer, V. M. Hirsch, and B. H. Hahn.** 2000. Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. *Biochem Soc Trans* **28**:275-82.
360. **Sharp, P. M., D. L. Robertson, F. Gao, and B. Hahn.** 1994. Origins and diversity of human immunodeficiency viruses. *AIDS* **8**:S27-S42.
361. **Sharp, P. M., G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 2005. Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J Virol* **79**:3891-902.

362. **Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim.** 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**:646-50.
363. **Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim.** 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**:1404-7.
364. **Sheppard, H. W., C. Celum, N. L. Michael, S. O'Brien, M. Dean, M. Carrington, D. Dondero, and S. P. Buchbinder.** 2002. HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**:307-13.
365. **Shiver, J. W., T. M. Fu, L. Chen, D. R. Casimiro, M. E. Davies, R. K. Evans, Z. Q. Zhang, A. J. Simon, W. L. Trigona, S. A. Dubey, L. Huang, V. A. Harris, R. S. Long, X. Liang, et al.** 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* **415**:331-5.
366. **Simon, F., P. Maucere, P. Roques, I. Loussert-Ajaka, M. C. Muller-Trutwin, S. Saragosti, M. C. Georges-Courbot, F. Barre-Sinoussi, and F. Brun-Vezinet.** 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**:1032-7.
367. **Simon, F., S. Souquiere, F. Damond, A. Kfutwah, M. Makuwa, E. Leroy, P. Rouquet, J. L. Berthier, J. Rigoulet, A. Lecu, P. T. Telfer, I. Pandrea, J. C. Plantier, F. Barre-Sinoussi, P. Roques, M. C. Muller-Trutwin, and C. Apetrei.** 2001. Synthetic peptide strategy for the detection of and discrimination among highly divergent primate lentiviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:937-52.
368. **Simon, J. H., and M. H. Malim.** 1996. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes. *J Virol* **70**:5297-305.
369. **Soares, M. A., D. L. Robertson, H. Hui, J. S. Allan, G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 1997. A full-length and replication-competent proviral clone of SIVAGM from tantalus monkeys. *Virology* **228**:394-9.
370. **Soriano, V., P. Gomes, W. Heneine, A. Holguin, M. Doruana, R. Antunes, K. Mansinho, W. M. Switzer, C. Araujo, V. Shanmugam, H. Lourenco, J. Gonzalez-Lahoz, and F. Antunes.** 2000. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* **61**:111-6.
371. **Souquiere, S., F. Bibollet-Ruche, D. L. Robertson, M. Makuwa, C. Apetrei, R. Onanga, C. Kornfeld, J. C. Plantier, F. Gao, K. Abernethy, L. J. White, W. Karesh, P. Telfer, E. J. Wickings, P. Maucere, P. A. Marx, F. Barre-Sinoussi, B.**

- H. Hahn, M. C. Muller-Trutwin, and F. Simon.** 2001. Wild *Mandrillus sphinx* are carriers of two types of lentivirus. *J Virol* **75**:7086-96.
372. **Sousa, A. E., A. F. Chaves, A. Loureiro, and R. M. Victorino.** 2001. Comparison of the frequency of interleukin (IL)-2-, interferon-gamma-, and IL-4-producing T cells in 2 diseases, human immunodeficiency virus types 1 and 2, with distinct clinical outcomes. *J Infect Dis* **184**:552-9.
373. **Spence, R. A., W. M. Kati, K. S. Anderson, and K. A. Johnson.** 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* **267**:988-93.
374. **Spira, S., M. A. Wainberg, H. Loemba, D. Turner, and B. G. Brenner.** 2003. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* **51**:229-40.
375. **Stebbing, J., and G. Moyle.** 2003. The clades of HIV: their origins and clinical significance. *AIDS Rev* **5**:205-13.
376. **Stopak, K., C. de Noronha, W. Yonemoto, and W. C. Greene.** 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**:591-601.
377. **Stove, V., I. Van de Walle, E. Naessens, E. Coene, C. Stove, J. Plum, and B. Verhasselt.** 2005. Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alpha. *J Virol* **79**:11422-33.
378. **Stratov, I., R. DeRose, D. F. Purcell, and S. J. Kent.** 2004. Vaccines and vaccine strategies against HIV. *Curr Drug Targets* **5**:71-88.
379. **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**:728-30.
380. **Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski.** 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**:848-53.
381. **Swanson, P., C. de Mendoza, Y. Joshi, A. Golden, R. L. Hodinka, V. Soriano, S. G. Devare, and J. Hackett, Jr.** 2005. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT. *J Clin Microbiol* **43**:3860-8.
382. **Swigut, T., N. Shohdy, and J. Skowronski.** 2001. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *Embo J* **20**:1593-604.

383. **Switzer, W. M., B. Parekh, V. Shanmugam, V. Bhullar, S. Phillips, J. J. Ely, and W. Heneine.** 2005. The epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in a large number of wild- and captive-born chimpanzees: evidence for a recent introduction following chimpanzee divergence. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**:335-42.
384. **Takehisa, J., Y. Harada, N. Ndembi, I. Mboudjeka, Y. Taniguchi, C. Ngansop, S. Kuate, L. Zekeng, K. Ibuki, T. Shimada, B. Bikandou, Y. Yamaguchi-Kabata, T. Miura, M. Ikeda, H. Ichimura, L. Kaptue, and M. Hayami.** 2001. Natural infection of wild-born mandrills (*Mandrillus sphinx*) with two different types of simian immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:1143-54.
385. **Takehisa, J., L. Zekeng, E. Ido, I. Mboudjeka, H. Moriyama, T. Miura, M. Yamashita, L. G. Gurtler, M. Hayami, and L. Kaptue.** 1998. Various types of HIV mixed infections in Cameroon. *Virology* **245**:1-10.
386. **Takehisa, J., L. Zekeng, E. Ido, Y. Yamaguchi-Kabata, I. Mboudjeka, Y. Harada, T. Miura, L. Kaptue, and M. Hayami.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in Cameroon. *J Virol* **73**:6810-20.
387. **Takemura, T., M. Ekwilanga, B. Bikandou, E. Ido, Y. Yamaguchi-Kabata, S. Ohkura, H. Harada, J. Takehisa, H. Ichimura, H. J. Parra, M. Nende, E. Mubwo, M. Sepole, M. Hayami, and T. Miura.** 2005. A novel simian immunodeficiency virus from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in the Democratic Republic of Congo. *J Gen Virol* **86**:1967-71.
388. **Takemura, T., and M. Hayami.** 2004. Phylogenetic analysis of SIV derived from mandrill and drill. *Front Biosci* **9**:513-20.
389. **Tantillo, C., J. Ding, A. Jacobo-Molina, R. G. Nanni, P. L. Boyer, S. H. Hughes, R. Pauwels, K. Andries, P. A. Janssen, and E. Arnold.** 1994. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol* **243**:369-87.
390. **Tebit, D. M., L. Zekeng, L. Kaptue, M. Salminen, H. G. Krausslich, and O. Herchenroder.** 2002. Genotypic and phenotypic analysis of HIV type 1 primary isolates from western Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:39-48.
391. **Telfer, P. T., S. Souquiere, S. L. Clifford, K. A. Abernethy, M. W. Bruford, T. R. Disotell, K. N. Sterner, P. Roques, P. A. Marx, and E. J. Wickings.** 2003. Molecular evidence for deep phylogenetic divergence in *Mandrillus sphinx*. *Mol Ecol* **12**:2019-24.
392. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**:4876-82.

393. **Thomson, M. M., L. Perez-Alvarez, and R. Najera.** 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* **2**:461-71.
394. **Tosi, A. J., T. R. Disotell, J. C. Morales, and D. J. Melnick.** 2003. Cercopithecine Y-chromosome data provide a test of competing morphological evolutionary hypotheses. *Mol Phylogenet Evol* **27**:510-21.
395. **Traina-Dorge, V., J. Blanchard, L. Martin, and M. Murphey-Corb.** 1992. Immunodeficiency and lymphoproliferative disease in an African green monkey dually infected with SIV and STLV-I. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:97-100.
396. **Triques, K., A. Bourgeois, S. Saragosti, N. Vidal, E. Mpoudi-Ngole, N. Nzilambi, C. Apetrei, M. Ekwilanga, E. Delaporte, and M. Peeters.** 1999. High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. *Virology* **259**:99-109.
397. **Triques, K., A. Bourgeois, N. Vidal, E. Mpoudi-Ngole, C. Mulanga-Kabeya, N. Nzilambi, N. Torimiro, E. Saman, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2000. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:139-51.
398. **Tsang, V. C., J. M. Peralta, and A. R. Simons.** 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **92**:377-91.
399. **Tscherning, C., A. Alaeus, R. Fredriksson, A. Bjorndal, H. Deng, D. R. Littman, E. M. Fenyo, and J. Albert.** 1998. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* **241**:181-8.
400. **Tsujimoto, H., R. W. Cooper, T. Kodama, M. Fukasawa, T. Miura, Y. Ohta, K. Ishikawa, M. Nakai, E. Frost, G. E. Roelants, et al.** 1988. Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **62**:4044-50.
401. **Tuailon, E., M. Gueudin, V. Lemee, I. Gueit, P. Roques, G. E. Corrigan, J. C. Plantier, F. Simon, and J. Braun.** 2004. Phenotypic susceptibility to nonnucleoside inhibitors of virion-associated reverse transcriptase from different HIV types and groups. *J Acquir Immune Defic Syndr* **37**:1543-9.
402. **Urassa, W., S. Nozohoor, S. Jaffer, K. Karama, F. Mhalu, and G. Biberfeld.** 2002. Evaluation of an alternative confirmatory strategy for the diagnosis of HIV infection in Dar Es Salaam, Tanzania, based on simple rapid assays. *J Virol Methods* **100**:115-20.
403. **van der Groen, G., P. N. Nyambi, E. Beirnaert, D. Davis, K. Fransen, L. Heyndrickx, P. Ondo, G. Van der Auwera, and W. Janssens.** 1998. Genetic

- variation of HIV type 1: relevance of interclade variation to vaccine development. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 3**:S211-21.
404. **van der Kuyl, A. C., J. T. Dekker, and J. Goudsmit.** 2000. Primate genus *Miopithecus*: evidence for the existence of species and subspecies of dwarf guenons based on cellular and endogenous viral sequences. *Mol Phylogenet Evol* **14**:403-13.
405. **van der Kuyl, A. C., R. van den Burg, M. J. Hoyer, R. A. Gruters, A. D. Osterhaus, and B. Berkhout.** 2004. SIVdrl detection in captive mandrills: are mandrills infected with a third strain of simian immunodeficiency virus? *Retrovirology* **1**:36.
406. **Van Dooren, S., W. M. Switzer, W. Heneine, P. Goubau, E. Verschoor, B. Parekh, W. De Meurichy, C. Furley, M. Van Ranst, and A. M. Vandamme.** 2002. Lack of evidence for infection with simian immunodeficiency virus in bonobos. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:213-6.
407. **Van Harmelen, J. H., E. Van der Ryst, A. S. Loubser, D. York, S. Madurai, S. Lyons, R. Wood, and C. Williamson.** 1999. A predominantly HIV type 1 subtype C-restricted epidemic in South African urban populations. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**:395-8.
408. **Van Laethem, K., A. De Luca, A. Antinori, A. Cingolani, C. F. Perna, and A. M. Vandamme.** 2002. A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients. *Antivir Ther* **7**:123-9.
409. **van Rensburg, E. J., S. Engelbrecht, J. Mwenda, J. D. Laten, B. A. Robson, T. Stander, and G. K. Chege.** 1998. Simian immunodeficiency viruses (SIVs) from eastern and southern Africa: detection of a SIVagm variant from a chacma baboon. *J Gen Virol* **79 (Pt 7)**:1809-14.
410. **Vandamme, A. M., K. Van Laethem, and E. De Clercq.** 1999. Managing resistance to anti-HIV drugs: an important consideration for effective disease management. *Drugs* **57**:337-61.
411. **Vanden Haesevelde, M., J. L. Decourt, R. J. De Leys, B. Vanderborght, G. van der Groen, H. van Heuverswijn, and E. Saman.** 1994. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol* **68**:1586-96.
412. **Vanden Haesevelde, M. M., M. Peeters, G. Jannes, W. Janssens, G. van der Groen, P. M. Sharp, and E. Saman.** 1996. Sequence analysis of a highly divergent HIV-1-related lentivirus isolated from a wild captured chimpanzee. *Virology* **221**:346-50.
413. **Vergne, L., A. Bourgeois, E. Mpoudi-Ngole, R. Mougnotou, J. Mbuagbaw, F. Liegeois, C. Laurent, C. Butel, L. Zekeng, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2003. Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group

- M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology* **310**:254-66.
414. **Vergne, L., M. Peeters, E. Mpoudi-Ngole, A. Bourgeois, F. Liegeois, C. Toure-Kane, S. Mboup, C. Mulanga-Kabeya, E. Saman, J. Jourdan, J. Reynes, and E. Delaporte.** 2000. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients. *J Clin Microbiol* **38**:3919-25.
415. **Vergne, L., J. Snoeck, A. F. Aghokeng, B. Maes, D. Valea, E. Delaporte, A. M. Vandamme, M. Peeters, and K. Van Laethem.** 2006. Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naive and treated patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **46**(1):53-62.
416. **Verschoor, E. J., Z. Fagrouch, I. Bontjer, H. Niphuis, and J. L. Heeney.** 2004. A novel simian immunodeficiency virus isolated from a Schmidt's guenon (*Cercopithecus ascanius schmidti*). *J Gen Virol* **85**:21-4.
417. **Vidal, N., C. Mulanga, S. Edidi Bazepeo, F. Lepira, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2006. Identification and Molecular Characterization of Subsubtype A4 in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses (in press)*.
418. **Vidal, N., M. Peeters, C. Mulanga-Kabeya, N. Nzilambi, D. Robertson, W. Ilunga, H. Sema, K. Tshimanga, B. Bongo, and E. Delaporte.** 2000. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* **74**:10498-507.
419. **von Dornum, M., and M. Ruvolo.** 1999. Phylogenetic relationships of the New World monkeys (Primates, platyrrhini) based on nuclear G6PD DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* **11**:459-76.
420. **Wainberg, M. A.** 2004. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *Aids* **18 Suppl 3**:S63-8.
421. **Walker, D. K., S. Abel, P. Comby, G. J. Muirhead, A. N. Nedderman, and D. A. Smith.** 2005. Species differences in the disposition of the CCR5 antagonist, UK-427,857, a new potential treatment for HIV. *Drug Metab Dispos* **33**:587-95.
422. **Wang, J. K., E. Kiyokawa, E. Verdin, and D. Trono.** 2000. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:394-9.
423. **Weber, B., A. Berger, H. Rabenau, and H. W. Doerr.** 2002. Evaluation of a new combined antigen and antibody human immunodeficiency virus screening assay, VIDAS HIV DUO Ultra. *J Clin Microbiol* **40**:1420-6.

424. **Weber, B., E. H. Fall, A. Berger, and H. W. Doerr.** 1998. Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. *J Clin Microbiol* **36**:2235-9.
425. **Wei, P., M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer, and K. A. Jones.** 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**:451-62.
426. **Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, et al.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117-22.
427. **Weisman, Z., A. Kalinkovich, G. Borkow, M. Stein, Z. Greenberg, and Z. Bentwich.** 1999. Infection by different HIV-1 subtypes (B and C) results in a similar immune activation profile despite distinct immune backgrounds. *J Acquir Immune Defic Syndr* **21**:157-63.
428. **Weissenhorn, W., L. J. Calder, A. Dessen, T. Laue, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1997. Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 gp41 ectodomain expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6065-9.
429. **West, C. M.** 2003. Evolutionary and functional implications of the complex glycosylation of Skp1, a cytoplasmic/nuclear glycoprotein associated with polyubiquitination. *Cell Mol Life Sci* **60**:229-40.
430. **Wild, C., T. Oas, C. McDanal, D. Bolognesi, and T. Matthews.** 1992. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10537-41.
431. **Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews.** 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9770-4.
432. **Wolfe, N. D., W. M. Switzer, J. K. Carr, V. B. Bhullar, V. Shanmugam, U. Tamoufe, A. T. Prosser, J. N. Torimiro, A. Wright, E. Mpoudi-Ngole, F. E. McCutchan, D. L. Birx, T. M. Folks, D. S. Burke, and W. Heneine.** 2004. Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet* **363**:932-7.
433. **World Health Organization.** 1992. Recommendations for the selection and use of HIV antibody tests. *Weekly Epidemiological Record* **67**:145-152.
434. **Worobey, M., M. L. Santiago, B. F. Keele, J. B. Ndjanga, J. B. Joy, B. L. Labama, A. B. Dhed, A. Rambaut, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 2004. Origin of AIDS: contaminated polio vaccine theory refuted. *Nature* **428**:820.

435. **Wyand, M. S., K. Manson, D. C. Montefiori, J. D. Lifson, R. P. Johnson, and R. C. Desrosiers.** 1999. Protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus against heterologous challenge. *J Virol* **73**:8356-63.
436. **Xu, J. Y., M. K. Gorny, T. Palker, S. Karwowska, and S. Zolla-Pazner.** 1991. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J Virol* **65**:4832-8.
437. **Yamaguchi, J., P. Bodelle, A. S. Vallari, R. Coffey, C. P. McArthur, G. Schochetman, S. G. Devare, and C. A. Brennan.** 2004. HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:944-57.
438. **Yamaguchi, J., S. G. Devare, and C. A. Brennan.** 2000. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:925-30.
439. **Yamaguchi, J., A. S. Vallari, P. Swanson, P. Bodelle, L. Kaptue, C. Ngansop, L. Zekeng, L. G. Gurtler, S. G. Devare, and C. A. Brennan.** 2002. Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:269-82.
440. **Yang, C., B. Dash, S. L. Hanna, H. S. Frances, N. Nzilambi, R. C. Colebunders, M. St Louis, T. C. Quinn, T. M. Folks, and R. B. Lal.** 2001. Predominance of HIV type 1 subtype G among commercial sex workers from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:361-5.
441. **Yang, C., M. Li, R. D. Newman, Y. P. Shi, J. Ayisi, A. M. van Eijk, J. Otieno, A. O. Misore, R. W. Steketee, B. L. Nahlen, and R. B. Lal.** 2003. Genetic diversity of HIV-1 in western Kenya: subtype-specific differences in mother-to-child transmission. *Aids* **17**:1667-74.
442. **Yang, Z.** 1993. Maximum-likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites. *Mol Biol Evol* **10**:1396-401.
443. **Young, S. D.** 2001. Inhibition of HIV-1 integrase by small molecules: the potential for a new class of AIDS chemotherapeutics. *Curr Opin Drug Discov Devel* **4**:402-10.
444. **Young, S. D., S. F. Britcher, L. O. Tran, L. S. Payne, W. C. Lumma, T. A. Lyle, J. R. Huff, P. S. Anderson, D. B. Olsen, S. S. Carroll, et al.** 1995. L-743, 726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:2602-5.
445. **Yu, X., Y. Yu, B. Liu, K. Luo, W. Kong, P. Mao, and X. F. Yu.** 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**:1056-60.

446. **Zazzi, M., L. Romano, G. Venturi, R. W. Shafer, C. Reid, F. Dal Bello, C. Parolin, G. Palu, and P. E. Valensin.** 2004. Comparative evaluation of three computerized algorithms for prediction of antiretroviral susceptibility from HIV type 1 genotype. *J Antimicrob Chemother* **53**:356-60.
447. **Zhang, J., and H. M. Temin.** 1994. Retrovirus recombination depends on the length of sequence identity and is not error prone. *J Virol* **68**:2409-14.
448. **Zhao, R. Y., M. Bukrinsky, and R. T. Elder.** 2005. HIV-1 viral protein R (Vpr) & host cellular responses. *Indian J Med Res* **121**:270-86.
449. **Zheng, Y. H., A. Plemenitas, C. J. Fielding, and B. M. Peterlin.** 2003. Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8460-5.
450. **Zhou, Q., and P. A. Sharp.** 1995. Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. *Embo J* **14**:321-8.
451. **Zhuang, J., A. E. Jetzt, G. Sun, H. Yu, G. Klarmann, Y. Ron, B. D. Preston, and J. P. Dougherty.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol* **76**:11273-82.

RESUME

Les primates africains sont les hôtes naturels de divers lentivirus (SIV), dont deux sont à l'origine des HIV-1 et 2. Ces lentivirus simiens et humains sont caractérisés par une importante diversité génétique qui a des conséquences aussi bien sur le diagnostic de ces infections, que sur la prise en charge thérapeutique et la prévention. Les travaux de cette thèse visaient deux principaux objectifs: Premièrement, évaluer l'impact de la variabilité génétique des souches non-B circulant au Cameroun et en Afrique centrale sur l'efficacité des outils de diagnostic sérologique, l'objectivité des algorithmes d'interprétation des résistances (Stanford, Rega et ANRS), et la sensibilité d'un inhibiteur de fusion (T20). Deuxièmement, développer des outils de diagnostic sérologique spécifiques aux SIV permettant de mieux apprécier la diversité et l'épidémiologie de ces virus et caractériser les SIV infectant les primates avec lesquels les hommes sont en contact régulier afin de mieux orienter les stratégies de prévention de nouvelles zoonoses lentivirales.

Les résultats de nos travaux ont montré la fiabilité des outils de diagnostic sérologique utilisés au Cameroun et l'absence de mutations dans la région immunodominante de la gp41 pouvant réduire la sensibilité de ces tests. Plusieurs résultats indéterminés ont néanmoins été identifiés et soulignent la complexité du diagnostic sérologique dans les régions où prédominent les variants non-B et la nécessité d'adapter les choix des tests à la diversité locale. Nous avons également mis en évidence des discordances d'interprétation entre les trois algorithmes d'interprétation des résistances lorsqu'ils sont appliqués aux souches non-B. Des mutations pouvant être corrélées à ces discordances ont également été identifiées dans la protéase et la RT. La sensibilité du T20 par rapport aux souches non-B a également été montrée et prouve que cette nouvelle classe d'ARV peut efficacement être utilisée dans les régions où circulent ces variants.

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons développé et validé des stratégies de diagnostic des SIV utilisant des peptides V3 et des protéines recombinantes gp41 et un immunoblot SIVgsn-spécifique. Nous avons montré grâce à ces nouveaux outils que la prévalence de l'infection à SIV chez les primates africains peut considérablement varier d'une espèce à l'autre. Les facteurs influençant la susceptibilité de ces primates à cette infection restent néanmoins à déterminer. Enfin, nous avons identifié et caractérisé pour la première fois un second groupe SIV chez le *C. cephus* et montré la complexité de l'origine et de l'évolution des lentivirus de primates à travers la caractérisation des SIVmnd2 chez les mandrills au Cameroun. Dans la continuité de ce travail, il sera indispensable de poursuivre la caractérisation de nouveaux SIV chez les primates non encore testés et de vérifier d'autres transmissions de SIV du singe à l'homme, autres que celles des SIVcpz et SIVsmm. Nos outils de diagnostic SIV-spécifiques nouvellement développés pourront être adaptés dans ce but.

TITLE: Genetic diversity of human and simian lentiviruses in Cameroon: public health implications

ABSTRACT

African non-human primates are the natural hosts of diverse lentiviruses (SIV), two of which are simian counterparts of HIV-1 and 2. These simian and human lentiviruses are characterized by a high genetic variability with several implications on diagnosis, treatment and prevention. In this thesis, we aimed at evaluating the impact of HIV-1 non-B genetic diversity on serological diagnostic tools, reliability of drug resistance interpretation algorithms and susceptibility of a fusion inhibitor (T20). We next investigated on the development of serological SIV-specific assays to accurately define SIV diversity and epidemiology, and we finally characterized SIV infecting primates regularly hunted and consumed to evaluate associated human zoonotic risk.

Our results showed a good reliability of serological diagnostic tools used in Cameroon and the absence of mutations in the gp41 immunodominant region, which could affect the sensitivity of these tests. However, several indeterminate results were found and emphasized the complexity of HIV diagnosis in regions where non-B strains are prevalent and the need of appropriate diagnostic algorithms. Our investigations also demonstrated that genotypic drug resistance algorithms produced discordant results when applied to non-B strains. Some mutations, which can be correlated to these discordances were identified in the protease and RT. We also showed the absence of primary resistance mutations to T20 in non-B samples from Cameroon, and proved that this new drug class could be used in area where HIV-1 non-B strains are circulating.

In the second part of this work, we developed and validated sensitive and specific SIV assays based on V3 peptides and gp41 recombinant proteins. We also developed a SIVgsn-specific immunoblot. Using these new assays, we demonstrated that SIV infection in the wild is not generally widespread and non-human primate hosts seem to differ in their susceptibility to SIV infection. Factors associated to this susceptibility remain to be determined. Finally, we identified and characterized a second SIV group in *C. cephus* species and showed the complexity of SIV origin and evolution through the characterisation of SIVmnd2 in mandrills from Cameroon. Following this work, we should continue to characterise SIV in primates not yet tested in order to gain further insights in their epidemiology. SIV zoonotic transmissions other than SIVcpz and SIVsmm should be also checked. Our new SIV-specific diagnostic strategies could be adapted for these purposes.

DISCIPLINE: Biologie-Santé (Virologie)

MOTS-CLES: Lentivirus, HIV, SIV, diversité génétique, Cameroun, diagnostic, algorithmes d'interprétation, résistance primaire, évolution, primate, zoonose, transmissions inter-espèces.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R OU DU LABORATOIRE: UMR 145 – UM1 "VIH & Maladies Associées"
Institut de Recherche pour le Développement (IRD). 911, avenue Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier, France.
