

Université de Montréal

**L'impact de la grossesse sur l'amplitude et la diversité de la
reconnaissance antigénique des lymphocytes T cytotoxiques
dirigés contre le VIH-1**

par

Elyse Jolette

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en microbiologie et immunologie

Septembre, 2008

© Elyse Jolette, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'impact de la grossesse sur l'amplitude et la diversité de la reconnaissance antigénique des
lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre le VIH-1

présenté par :
Elyse Jolette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Michel Roger, président-rapporteur
Hugo Soudeyns, directeur de recherche
Naglaa Shoukry, membre du jury

RÉSUMÉ

La transmission mère-enfant (TME) du VIH-1 est un des enjeux majeurs de la pandémie. Une meilleure compréhension de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (LTC) VIH-spécifiques lors de la grossesse facilitera le design de stratégies optimales pour diminuer la TME. Notre objectif est donc de caractériser l'amplitude et la diversité de la reconnaissance antigénique des LTC VIH-spécifiques avant, pendant et après la grossesse chez des femmes infectées par le VIH-1. Nos résultats montrent pour la première fois que l'initiation et la progression de la grossesse, à elles seules, n'ont que peu d'influence sur l'amplitude et la diversité de la reconnaissance antigénique des réponses LTC en termes de production d'IFN- γ . Ces résultats indiquent que les femmes infectées par le VIH conservent une immunocompétence durant leur grossesse, du moins dans le contexte d'un traitement antirétroviral efficace. Ceci pourrait éventuellement aider à promouvoir l'immunisation comme stratégie pour prévenir la TME du VIH-1.

Mots-clés : lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, LTC, VIH, grossesse, ELISpot, IFN- γ , Gag, transmission mère-enfant, TME

ABSTRACT

Mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1 is one of the major issues of the pandemic. Characterization of HIV-specific immunity during pregnancy, especially cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (CTL), will lead to a better understanding of HIV pathogenesis and facilitate design of optimal strategies to prevent MTCT. Our objective is to describe the magnitude and the breadth of antigen recognition of HIV-specific CTL responses before, throughout and after pregnancy in a group of HIV-infected women. Our results revealed for the first time that initiation of pregnancy by itself doesn't change the magnitude of CTL responses in terms of IFN- γ production. These findings support the fact that HIV-infected women maintain immunocompetence throughout gestation, at least in the context of effective antiretroviral treatment. These results provide a novel understanding of the dynamics of HIV-specific CTL responses during pregnancy and may help to promote maternal immunization as a strategy to prevent MTCT of HIV-1.

Keywords : cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes, CTL, HIV, pregnancy, ELISpot, IFN- γ , Gag, mother-to-child transmission, MTCT

TABLE DES MATIÈRES

Introduction.....	1
1 Virus de l'immunodéficience humaine de type 1	2
1.1 Perspective historique.....	2
1.1.1 Origine du VIH.....	2
1.2 Épidémiologie et transmission.....	3
1.3 Classification du VIH	4
1.4 Structure du VIH.....	5
1.4.1 Particule virale.....	5
1.4.2 Génome du VIH-1	6
1.5 Cycle de réplication du VIH-1	7
1.6 Thérapie antirétrovirale.....	8
1.7 Tropisme du VIH-1.....	9
1.8 Évolution naturelle de l'infection	11
1.9 Diversité génétique du VIH	12
2 Transmission mère-enfant du VIH-1	15
2.1 Prévalence de l'infection par le VIH chez les femmes.....	15
2.2 Immunité maternelle durant la grossesse.....	15
2.3 Transmission mère-enfant du VIH-1	17
2.4 Mécanismes de la transmission mère-enfant du VIH-1	17
2.4.1 Transmission <i>in utero</i>	17
2.4.2 Transmission <i>intra-partum</i>	17
2.4.3 Transmission <i>post-partum</i>	18
2.5 Principaux facteurs de risque associés à la transmission mère-enfant du VIH-1 ..	18
.....	18
2.6 Principales stratégies pour la prévention de la transmission mère-enfant du	
VIH-1	20
2.6.1 Césarienne programmée	20
2.6.2 Allaitement	21
2.6.3 Prophylaxie antirétrovirale	21
2.7 Limites de la prophylaxie antirétrovirale.....	21
2.7.1 Accès limité aux antirétroviraux dans les pays en voie de développement	22

2.7.2	Toxicité des agents antirétroviraux pour la mère et l'enfant.....	22
2.7.3	Résistance du virus aux antirétroviraux	24
3	Lymphocytes T cytotoxiques et VIH-1	25
3.1	Mécanisme d'action des lymphocytes T cytotoxiques	25
3.1.1	Reconnaissance antigénique.....	25
3.1.2	Activités antivirales.....	27
3.2	Lymphocytes T cytotoxiques et le contrôle de la réplication du VIH-1.....	27
3.3	Lymphocytes T cytotoxiques au cours de l'évolution de l'infection par le VIH-1	28
3.4	Principaux mécanismes par lesquels le VIH-1 échappe à la réponse des lymphocytes T cytotoxiques	29
3.5	Effet de la prophylaxie antirétrovirale sur les lymphocytes T cytotoxiques VIH- spécifiques.....	30
3.6	Lymphocytes T cytotoxiques et la transmission mère-enfant du VIH-1	31
3.7	Développement d'un vaccin contre le VIH-1	32
3.7.1	Développement d'un vaccin pour prévenir la transmission mère-enfant du VIH-1	34
	Rationnel et hypothèse	35
	Article.....	38
	Discussion	81
	Conclusion	91
	Références.....	93

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau I: Antirétroviraux présentement disponibles.	8
Tableau II: Principaux facteurs de risque associés à la transmission mère-enfant du VIH-1.	18
Tableau III: Antirétroviraux utilisés pour prévenir la transmission mère-enfant du VIH-1.	23

Article

Table I. Clinical and demographic characteristics of HIV-infected study participants.	59
Table II. Individual HIV-specific CTL peptides recognized by three study participants.	67

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1.1 : Progression de l'épidémie du VIH, 1990-2007.....	3
Figure 1.2 : Distribution des individus (adultes et enfants) infectés par le VIH dans le monde, estimations 2007.....	4
Figure 1.3 : Particule virale du VIH-1.	5
Figure 1.4 : Organisation du génome du VIH-1 et les principales fonctions de ses 9 gènes.	6
Figure 1.5 : Représentation schématique du cycle de réplication du VIH.....	7
Figure 1.6 : Tropisme cellulaire du VIH-1.	10
Figure 1.7 : Évolution naturelle de l'infection par le VIH-1, basée sur la charge virale et le compte de lymphocytes T CD4 ⁺	11
Figure 1.8 : Arbre phylogénétique des groupes M, O et N du VIH-1 et de cinq différents isolats de SIVcpz.....	12
Figure 1.9 : Distribution mondiale des groupes (O et N), des clades et des formes recombinantes circulantes du VIH-1.....	13
Figure 2.1 : Pourcentage des adultes (15 ans et plus) vivant avec le VIH qui sont des femmes, 1990-2007.....	15
Figure 2.2 : Influence des hormones sur les lymphocytes T auxiliaires.	16
Figure 2.3 : Pourcentage de femmes enceintes infectées par le VIH recevant la prophylaxie antirétrovirale.	22
Figure 3.1 : Activités antivirales des LTC VIH-spécifiques.....	25
Figure 3.2 : Apprêtement et présentation antigéniques par les molécules de CMH-I.	26
Figure 3.3 : Dynamique de l'immunité acquise au cours de l'infection par le VIS.....	28
Figure 3.4 : Représentation schématique de l'efficacité des réponses de l'immunité acquise contre les différentes formes de VIH-1.....	33

Article

Figure 1. Clinical parameters in study participants.....	62
Figure 2. HIV-specific CTL precursor frequencies in study participants.....	63
Figure 3. HIV antigenic specificity of T cell microcultures derived from study participants.	64
Figure 4. Hierarchy of HIV-1 antigen recognition by T cell microcultures derived from study participants.	65
Figure 5. Evolution of HIV-1 peptide-specific CTL responses before, during, and after pregnancy.	66
Figure 6. Magnitude and breadth of HIV-specific CTL responses and control of viral load during pregnancy.....	70
Figure 7. Magnitude and breadth of HIV-specific CTL responses around the time of initiation of pregnancy.	71
Figure 8. Magnitude and breadth of HIV-specific CTL responses before, during and after pregnancy.	72
Supplemental data. Evolution of HIV-1 peptide-specific CTL responses before, during, and after pregnancy for 15 study participants.....	73

Discussion

Figure supplémentaire : Amplitude de la reconnaissance antigénique des réponses LTC dirigées contre le contrôle antigène-spécifique CEF avant, pendant et après la grossesse...90

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3TC	lamivudine
ADCC	<i>antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
APC	cellules présentatrices d'antigènes (<i>antigen-presenting cell</i>)
ARN	acide ribonucléique
AZT	zidovudine
CA	capside
CCR5	récepteur chimiokine CCR5
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMH-I/-II	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I/II
CRF	<i>circulating recombinant form</i>
CTL	lymphocytes T cytotoxiques (<i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
CXCR4	récepteur chimiokine CXCR4
D4T	stavudine
DDI	didanosine
ELISpot	<i>enzyme linked immunospot</i>
Env	enveloppe
Gag	<i>group-specific antigen</i>
gp	glycoprotéine
HAART	thérapie antirétrovirale combinée (<i>highly active antiretroviral therapy</i>)
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
IFN- γ	interféron- γ
IN	intégrase
INNTI	inhibiteurs non nucléosidiques de la RT
INTI	inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la RT
IL	interleukine
IP	inhibiteurs de la PR
Kb	kilobases
LTC	lymphocyte T cytotoxique
LTR	<i>long terminal repeat</i>

mL	millilitre
M	<i>main</i>
MA	matrice
MIP-1 α/β	<i>macrophage inflammatory protein-1α/β</i>
nm	nanomètre
N	<i>non-M, non-O</i>
NC	nucléocapside
Nef	effecteur négatif
NK	<i>Natural Killer</i>
NVP	névirapine
O	<i>outlier</i>
ONUSIDA	programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA
PACTG	<i>pediatric AIDS clinical trials group</i>
PBMC	<i>peripheral-blood mononuclear cell</i>
PD-1	<i>programmed death-1</i>
PIC	<i>pre-integration complex</i>
Pol	polymérase
PR	protéase
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted</i>
Rev	régulateur de l'expression des gènes viraux
RT	transcriptase inverse (<i>reverse transcriptase</i>)
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
Tat	activateur transcriptionnel
TCR	récepteur de cellules T (<i>T cell receptor</i>)
T _H 1/2	lymphocyte T auxiliaire de type 1/type 2
TNF- β	facteur de nécrose tumorale beta (<i>tumor necrosis factor-β</i>)
TME	transmission mère-enfant
μ L	microlitre
Vif	facteur d'infectivité virale
VIH-1/-2	virus de l'immunodéficience humaine de type 1/type 2
VIS	virus de l'immunodéficience simienne
Vpu	protéine virale U
Vpr	protéine virale R

À Jeff

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier Jeff qui m'a soutenu dans tous les aspects de ma maîtrise. Merci Jeff pour tes encouragements et ton aide inestimable. Je ne crois pas que j'aurais réussi à passer au travers sans toi.

Merci à Hugo qui m'a offert l'opportunité de travailler dans son laboratoire. Merci pour ta générosité. J'ai beaucoup appris à tes côtés autant des notions théoriques que sur le domaine de la recherche. Je te remercie plus que tout de m'avoir donné l'occasion d'aller présenter mes résultats à Paris.

Je remercie mes parents, Michel et Giselle, qui ont applaudi à chacun des mes bons coups. Merci pour votre soutien inébranlable.

Un grand merci à Martine qui m'a écoutée inlassablement me plaindre et me réjouir au cours de ces années. Merci pour ta patience et ta bonne humeur à toutes épreuves.

Je tiens finalement à remercier Doris, Natacha, Mathieu, Roland et Sandra pour leur camaraderie et leur aide à plusieurs égards.

INTRODUCTION

1 VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1

1.1 PERSPECTIVE HISTORIQUE

En 1981, les premiers cas d'une déficience immunitaire inhabituelle sont identifiés aux États-Unis, parmi des hommes homosexuels. Ceux-ci présentent des pathologies rares, y compris l'infection par le pathogène opportuniste *Pneumocystis jirovecii* (*P. carinii*) et le sarcome de Kaposi, caractérisé par des tumeurs de la peau et des organes internes. De plus, ces individus ont en commun un important déficit des réponses immunitaires cellulaires et une diminution significative des lymphocytes T CD4⁺ (Centers for Disease Control, 1981). Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est défini en 1982 et un nombre grandissant de cas est rapporté. Son agent étiologique est découvert et caractérisé par les efforts des laboratoires des docteurs Montagnier, Gallo et Levy (Barré-Sinoussi et al., 1983; Levy et al., 1984; Popovic et al., 1984). En 1985, le virus est officiellement nommé le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Un an plus tard, il est rebaptisé le VIH de type 1 (VIH-1), puisqu'en un autre rétrovirus humain connexe, mais toutefois distinct et moins pathogène, le VIH-2, est retrouvé chez des individus d'Afrique occidentale (Clavel et al., 1986).

1.1.1 Origine du VIH

L'émergence des VIH-1 et VIH-2 résulte du transfert inter-espèces des virus d'immunodéficience simienne (VIS) à l'humain. Toutefois, des analyses phylogénétiques indiquent que les VIH-1 et VIH-2 ont des origines distinctes. En effet, le virus SIVsm du singe mangabey cendré serait à l'origine du VIH-2 (Gao et al., 1992; 1994; Chen et al., 1997), tandis que le virus SIVcpz du chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* serait vraisemblablement l'ancêtre du VIH-1 (Gao et al., 1999). L'exposition directe au sang, aux sécrétions muco-sales et aux excréments des singes, au cours de la chasse, et la consommation de viande contaminée crue fournissent les mécanismes le plus plausibles par lequel le virus aurait été transmis à l'humain (Weiss et Wrangham, 1999). Des études suggèrent que l'apparition de l'ancêtre commun du groupe M du VIH-1 serait aux environs des années 1930, i.e. longtemps avant que les premiers cas de SIDA aient été identifiés (Goudsmit et Lukashov, 1999; Korber et al., 2000).

1.2 ÉPIDÉMIOLOGIE ET TRANSMISSION

L'infection par le VIH-1 constitue un problème de la plus haute importance à l'échelle mondiale. Les estimations font état de près de 25 millions de décès imputables au SIDA depuis 1990. On estime qu'en 2007, 33,2 millions [30,3 millions-36,1 millions] d'individus étaient infectés par le VIH à travers le monde (ONUSIDA, 2008) (Figure 1.1).

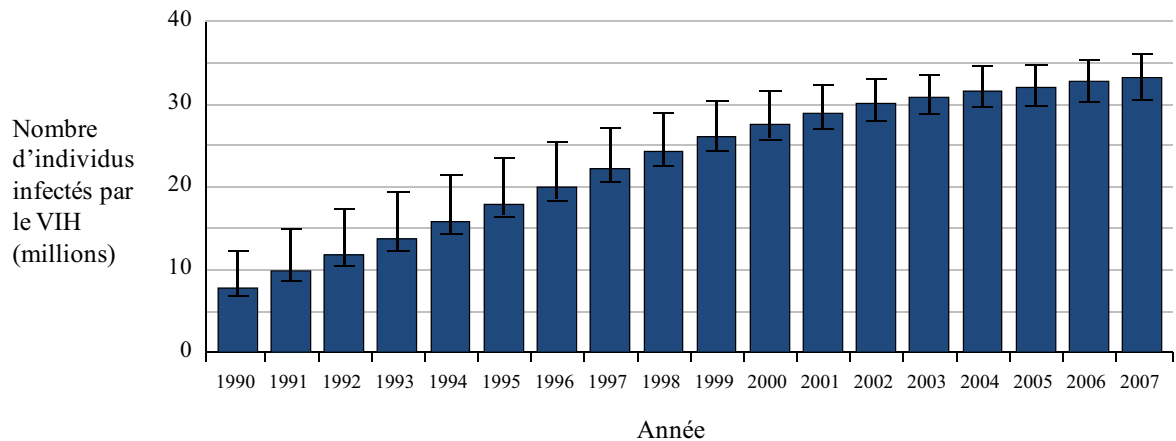


Figure 1.1 : Progression de l'épidémie du VIH, 1990-2007.

Estimation du nombre d'individus (adultes et enfants) infectés par le VIH dans le monde. Tirée d'ONUSIDA, 2007.

Plus de 7400 nouvelles infections par le VIH surviennent chaque jour, dont environ 1000 chez les enfants de moins de 15 ans. Chez les adultes, près de 50% des individus nouvellement infectés sont des femmes et environ 45% sont de jeunes adultes entre 15 et 24 ans (ONUSIDA, 2008). Ainsi, le nombre de personnes vivant avec le VIH continue d'augmenter. Ceci est dû principalement au fait qu'il n'existe pas de vaccin pour prévenir l'infection ou de traitements en mesure d'éradiquer l'infection.

La prévalence du VIH varie considérablement d'un continent à l'autre, d'un pays à l'autre. De fait, l'Afrique subsaharienne, la région la plus lourdement touchée par l'épidémie, compte près de 22 millions [20,5-23,6 millions] d'adultes et d'enfants infectés par le VIH, ce qui représente 67% du nombre mondial (Figure 1.2) (ONUSIDA, 2008).

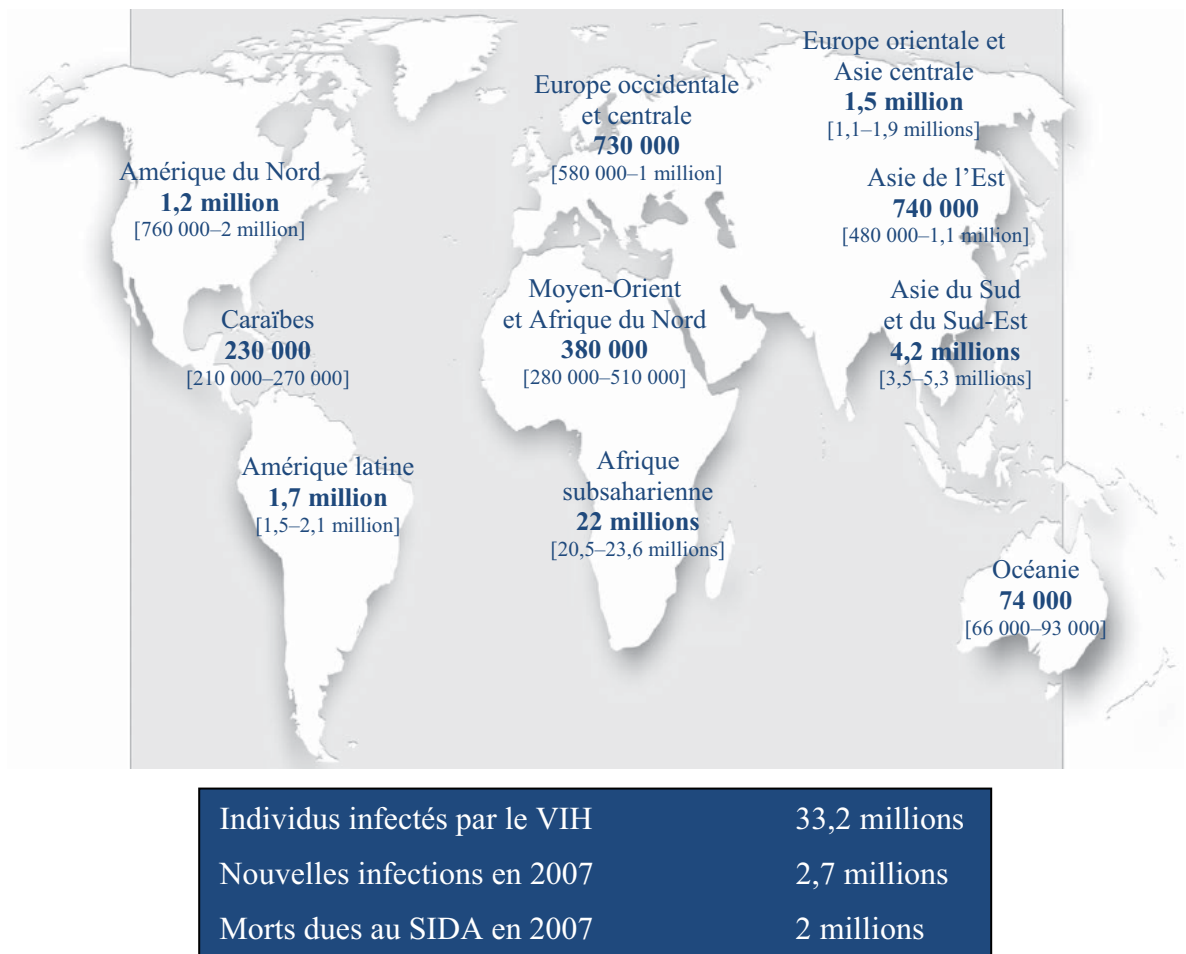


Figure 1.2 : Distribution des individus (adultes et enfants) infectés par le VIH dans le monde, estimations 2007.

Adaptée d'ONUSIDA, 2008.

Le VIH se transmet à l'occasion de rapports sexuels (anaux ou vaginaux) non protégés avec un partenaire infecté, lors d'une transfusion de sang ou de produits sanguins contaminés et suite au partage de seringues non-stérilisées ayant été auparavant utilisées par un individu infecté. Il se transmet aussi de la mère à l'enfant pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement au sein.

1.3 CLASSIFICATION DU VIH

Le VIH fait partie de la famille des *retroviridae*, du genre *lentivirus*. Les rétrovirus sont nommés ainsi à cause de leur transcriptase inverse qui transcrit leur ARN en ADN, formant ainsi un provirus, lequel est ensuite intégré au génome de l'hôte. Les lentivirus (du latin

lentus, signifiant «lent») se caractérisent par une longue période de latence et par conséquent, une évolution lente de la maladie (Fields, 2001).

1.4 STRUCTURE DU VIH

1.4.1 Particule virale

Les particules virales du VIH ont un diamètre de 100 à 120 nm et sont entourées d'une enveloppe, dérivée de la membrane de la cellule hôte (Figure 1.3). Chaque virion contient des complexes glycoprotéiques intégrés dans la double couche lipidique de l'enveloppe et composés de trimères de la glycoprotéine de surface gp120 et de la glycoprotéine transmembranaire gp41 (Zhu et al., 2003; 2006). La protéine MA (p17) tapisse la face interne de l'enveloppe et constitue la matrice. À l'intérieur se trouve la capsidie en forme de cône, qui est composée de protéines CA (p24). Le génome viral est composé de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive, d'approximativement 10 Kb, étroitement associées aux protéines de la nucléocapside NC (p7). Plusieurs exemplaires de la transcriptase inverse RT (p66), de l'intégrase IN (p31) et de la protéase PR (p11) sont présents dans chaque particule virale (Freed, 2001; HIV Sequence Compendium, 2008).

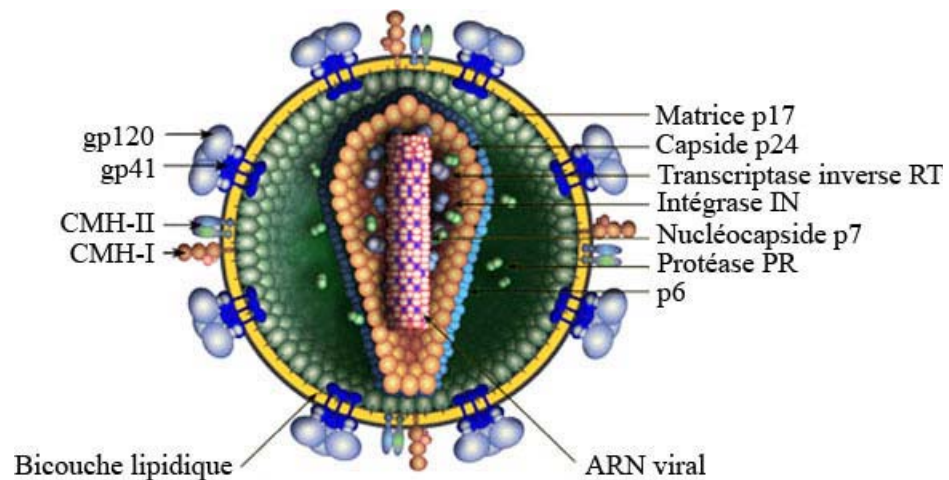


Figure 1.3 : Particule virale du VIH-1.

Adaptée de Henderson.

1.4.2 Génome du VIH-1

Le génome du VIH comprend les gènes *gag*, *pol* et *env* qui codent pour des précurseurs polyprotéiques dont le clivage par les protéases génère les protéines virales. Le gène *gag* (pour *group-specific antigen*) code pour les protéines MA, CA, NC et p6. Les enzymes codées par *pol* (pour polymérase) sont PR, RT et IN. Le gène *env* (pour enveloppe), quant à lui, code pour les glycoprotéines gp120 et gp41 (Freed, 2001).

En plus des gènes *gag*, *pol* et *env*, le génome du VIH-1 code aussi pour les protéines régulatrices Tat et Rev et les protéines accessoires Vif, Nef, Vpr et Vpu, dont les fonctions sont décrites brièvement à la figure 1.4 (Greene et Peterlin, 2002; Li et al., 2005; HIV Sequence Compendium, 2008).

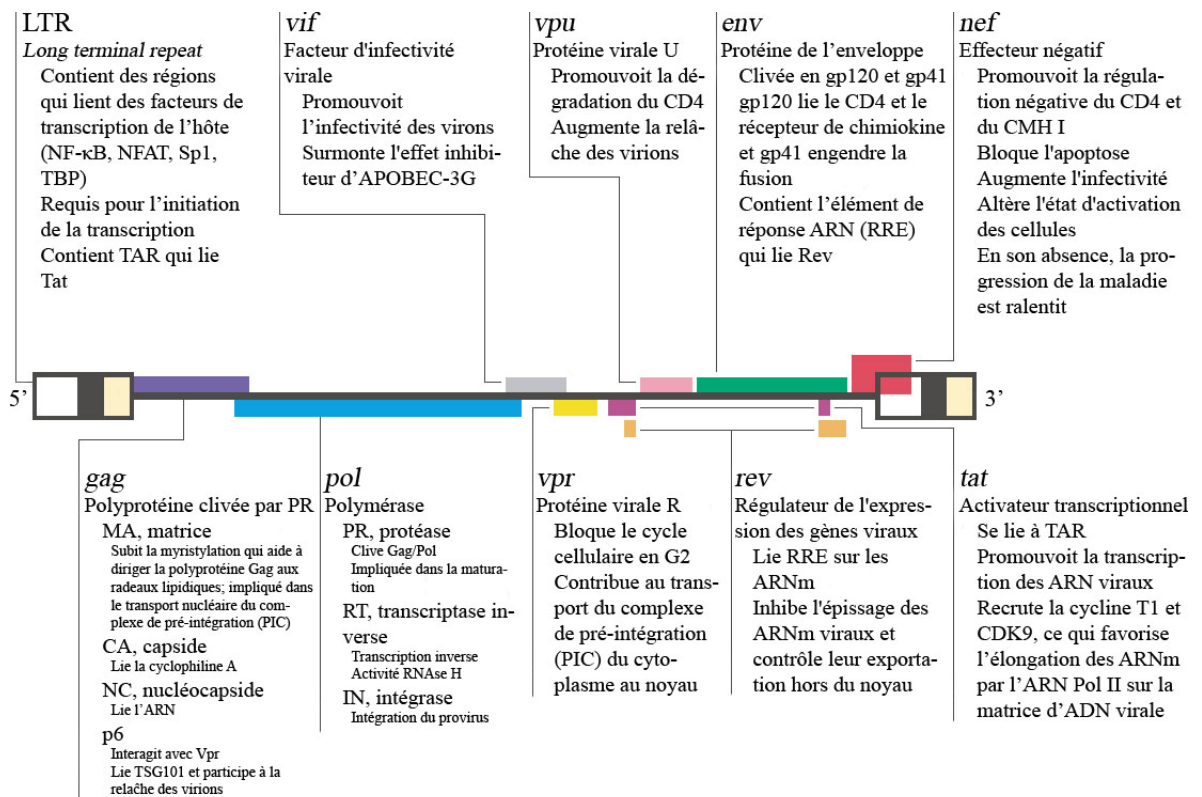


Figure 1.4 : Organisation du génome du VIH-1 et les principales fonctions de ses 9 gènes.

Adaptée de Greene et Peterlin, 2002.

1.5 CYCLE DE RÉPLICATION DU VIH-1

Une cascade d'évènements impliquant les glycoprotéines gp120 et gp41, le récepteur cellulaire CD4 (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1985) et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 (Deng et al., 1996; Dragic et al., 1998; Feng et al., 1996), aboutit à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire et, ultimement, à l'entrée du virus dans la cellule cible (Figure 1.5). Dans celle-ci, la nucléocapside est convertie d'abord en complexe de transcription inverse, ensuite en complexe de pré-intégration, lequel est acheminé au noyau. L'ADN linéaire double brin est alors intégré au génome de la cellule cible. Il est alors nommé provirus et peut demeurer latent et n'exprimer ni ARN messager ni protéine. Toutefois, dans certaines conditions, la transcription génère des ARN viraux qui sont transportés du noyau au cytoplasme. Les protéines virales sont alors traduites et transportées à la membrane cellulaire, où les virions sont assemblés et libérés de la cellule infectée par bourgeonnement. L'action de la protéase virale engendre des réarrangements structuraux qui mènent finalement à la maturation de la particule virale (Greene et Peterlin, 2002).

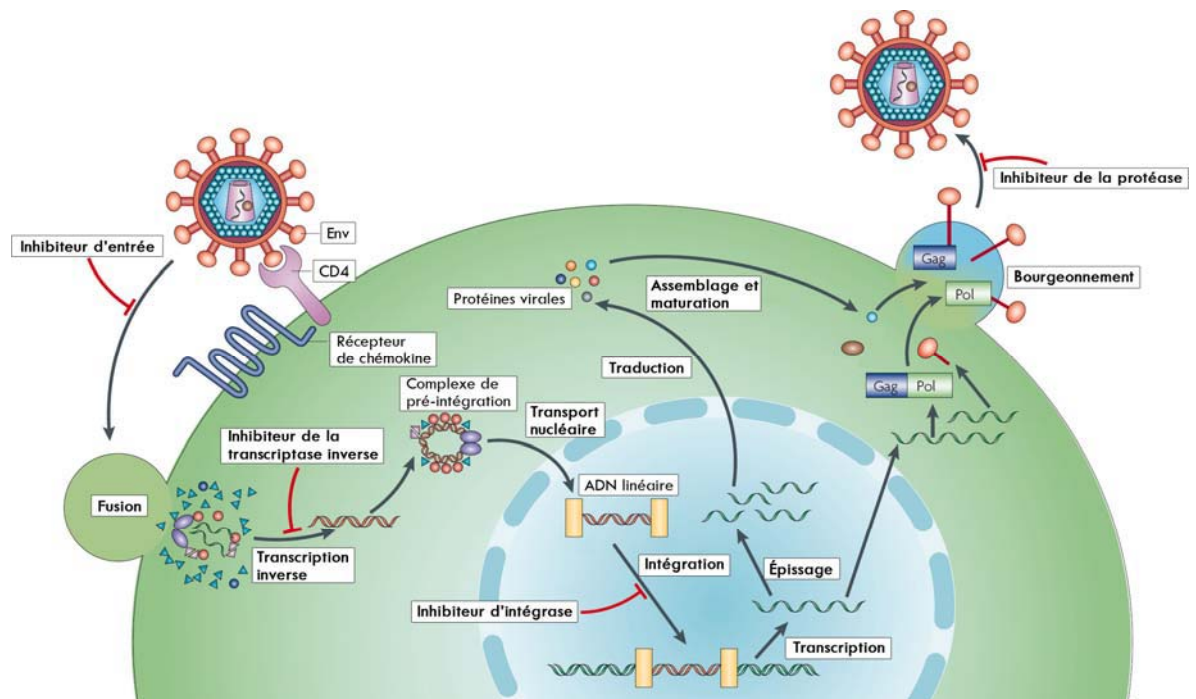


Figure 1.5 : Représentation schématique du cycle de réplication du VIH.

Modifiée de Han et al., 2007.

1.6 THÉRAPIE ANTIRÉTROVIRALE

Les agents antirétroviraux disponibles actuellement ciblent l'une des quatre étapes de la réplication : l'entrée du virus dans la cellule hôte, la transcription inverse de l'ARN en ADN, l'intégration du provirus et le clivage des précurseurs viraux par la protéase virale (Figure 1.5). Chaque classe et leurs antirétroviraux sont énumérés dans l'ordre approximatif de leur disponibilité dans le tableau I.

Tableau I: Antirétroviraux présentement disponibles.

Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse

Zidovudine (AZT), Didanosine (ddI), Stavudine (d4T), Lamivudine (3TC), Abacavir (ABC), Tenofovir (TNV), Emtricitabine (FTC)

Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

Nevirapine (NVP), Delavirdine (DLV), Efavirenz (EFV), Etravirine (TMC125)

Inhibiteurs de la protéase

Saquinavir (SQV), Indinavir (IDV), Ritonavir (RTV), Nelfinavir (NFV), Amprenavir (APV), Lopinavir/ritonavir (rLPV), Atazanavir (AZV), Tipranavir (TPV), Darunavir (TMC114)

Inhibiteurs d'entrée

Enfuvirtide (T-20), Maraviroc (MVC)

Inhibiteurs d'intégrase

Raltegravir (RAL)

Adapté de De Clercq, 2004; Flexner, 2007; Hammer et al., 2008.

Un schéma thérapeutique d'au moins trois antirétroviraux dont un inhibiteur de protéase est aujourd'hui la norme dans les pays industrialisés. Cette thérapie antirétrovirale combinée ou HAART (pour *Highly Active Antiretroviral Therapy*) est en mesure de maintenir la charge virale en-dessous du seuil de détection pour certains patients durant des années. De plus, les baisses significatives de morbidité et de mortalité associées à l'infection par le VIH sont largement attribuables à l'utilisation de la HAART (Mocroft et al., 1998; Palella et al., 1998; Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2008).

Les différents problèmes liés à l'utilisation des antirétroviraux seront discutés à la section 2.7, dans le contexte de la transmission de la mère à l'enfant du VIH-1.

1.7 TROPISME DU VIH-1

Les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes/macrophages sont les principales cibles du VIH (Dalglish et al., 1984; Gartner et al., 1986). De fait, le tropisme du virus est déterminé par la présence des récepteurs et corécepteurs à la surface cellulaire et est en lien avec la boucle V3 de la gp120 (Speck et al. 1997; Cho et al. 1998). Même si la molécule CD4 est suffisante pour l'attachement du virus à la surface cellulaire, les récepteurs de chimiokines, notamment CCR5 et CXCR4, sont les corécepteurs nécessaires à la fusion des membranes et à l'entrée du virus *in vivo* (Simmons et al., 1998; Genoud et al., 1999).

Ainsi, les souches qui utilisent préférentiellement le corécepteur CCR5 sont nommées R5 ou M-tropiques (pour monocyte/macrophage) (Deng et al., 1996; Dragic et al., 1998). Par opposition, les souches qui lient préférentiellement CXCR4 sont nommées X4 ou T-tropiques (pour lymphocyte T) (Feng et al., 1996). De plus, certaines souches peuvent utiliser CCR5 et CXCR4 et sont nommées R5X4 et un individu peut être infecté par un mélange de souches R5 et X4 (Figure 1.6) (Esté et Telenti, 2007).

Indépendamment du mode de transmission, les virus R5 sont préférentiellement transmis et prédominent durant les phases aiguë et chronique de la maladie (Chen et al., 1997; Scarlatti et al., 1997; Philpott, 2003). Toutefois, les souches R5 peuvent évoluer en populations R5X4 ou R5 et X4 (Figure 1.6). Les virus X4 émergent éventuellement chez 40-60% des individus infectés par le VIH-1 et sont associés à un déclin accéléré des populations T CD4⁺ et à une progression rapide de la maladie (Connor et al., 1997; Scarlatti et al., 1997).

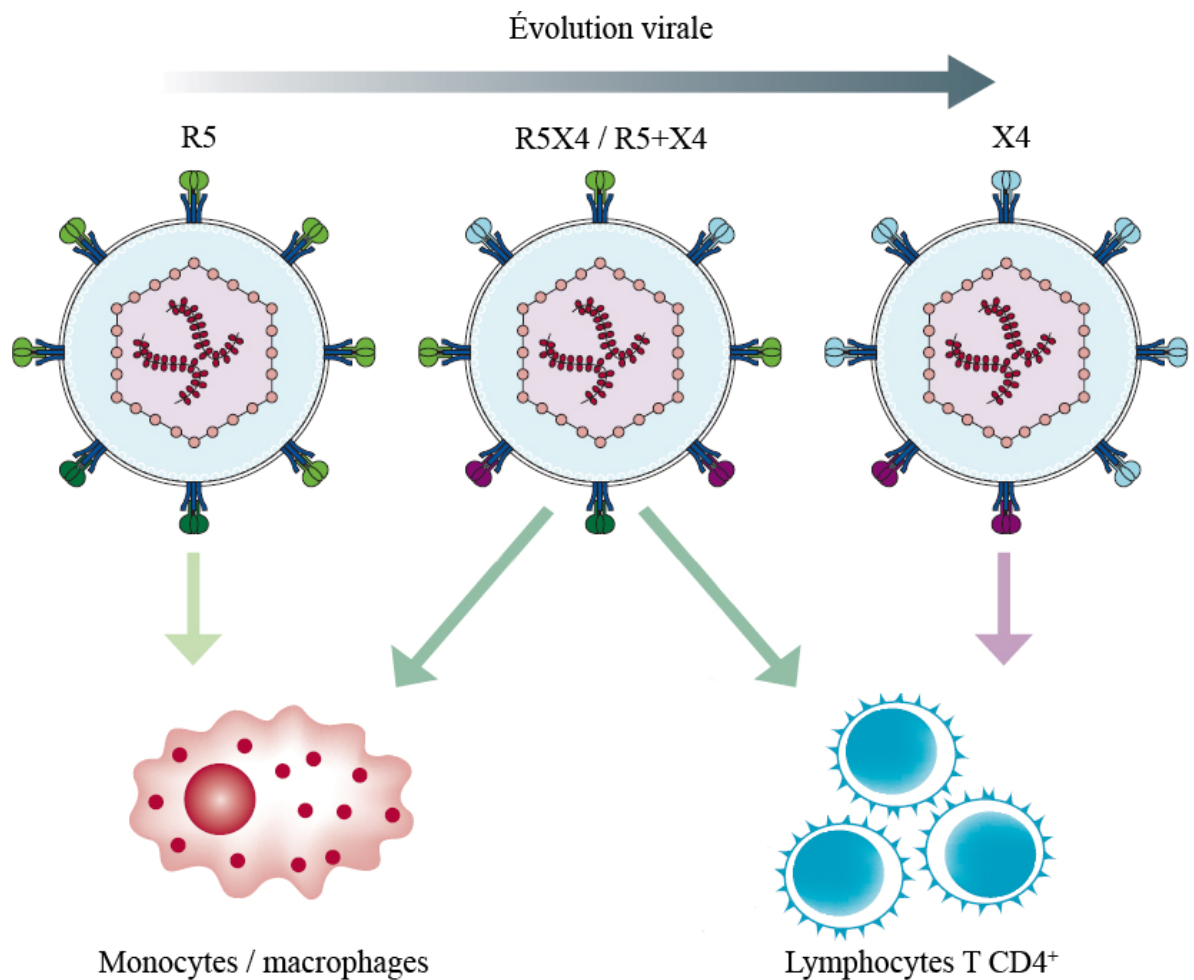


Figure 1.6 : Tropisme cellulaire du VIH-1.

Modifiée d'Esté et Telenti, 2007.

L'importance des corécepteurs est démontrée *in vivo* par le polymorphisme CCR5/ Δ 32, une délétion de 32 paires de bases dans le gène codant CCR5, présent chez près de 13% des individus de descendance d'Europe du Nord (Martinson et al., 1997). Étant donné que le récepteur CCR5 mutant n'atteint pas la surface cellulaire, les individus homozygotes pour cette mutation (1-2% de la population caucasienne) peuvent seulement être infectés par des souches du VIH utilisant le corécepteur CXCR4 (Samson et al., 1996) et montrent ainsi une importante résistance à l'infection par le VIH (Dean et al., 1996; Liu et al., 1996).

1.8 ÉVOLUTION NATURELLE DE L'INFECTION

L'intégration du génome du VIH au génome cellulaire marque l'infection définitive de l'organisme. Le déficit immunitaire lié à la destruction et/ou la détérioration fonctionnelle des lymphocytes T CD4⁺ par le virus conduit progressivement au SIDA en l'absence de traitement. L'infection aiguë par le VIH est caractérisée par un pic de la charge virale et une diminution transitoire des lymphocytes T CD4⁺ (Figure 1.7). Lors de cette phase, les symptômes apparaissent des jours, voire des semaines après l'exposition au VIH. Une période de latence clinique d'environ 10 ans s'ensuit, durant laquelle la production de virus et la destruction des lymphocytes T CD4⁺ s'opèrent de façon continue et augmentent progressivement avec l'évolution de l'infection. À la fin de la phase chronique, la virémie s'élève abruptement et le compte des lymphocytes T CD4⁺ diminue. Le SIDA est défini par l'apparition d'infections opportunistes et de certains cancers. Le risque de maladies augmente significativement lorsque le compte de lymphocytes T CD4⁺ tombe en-dessous de 200 cellules/μL (Pantaleo et al., 1993; Fauci et al., 1996).

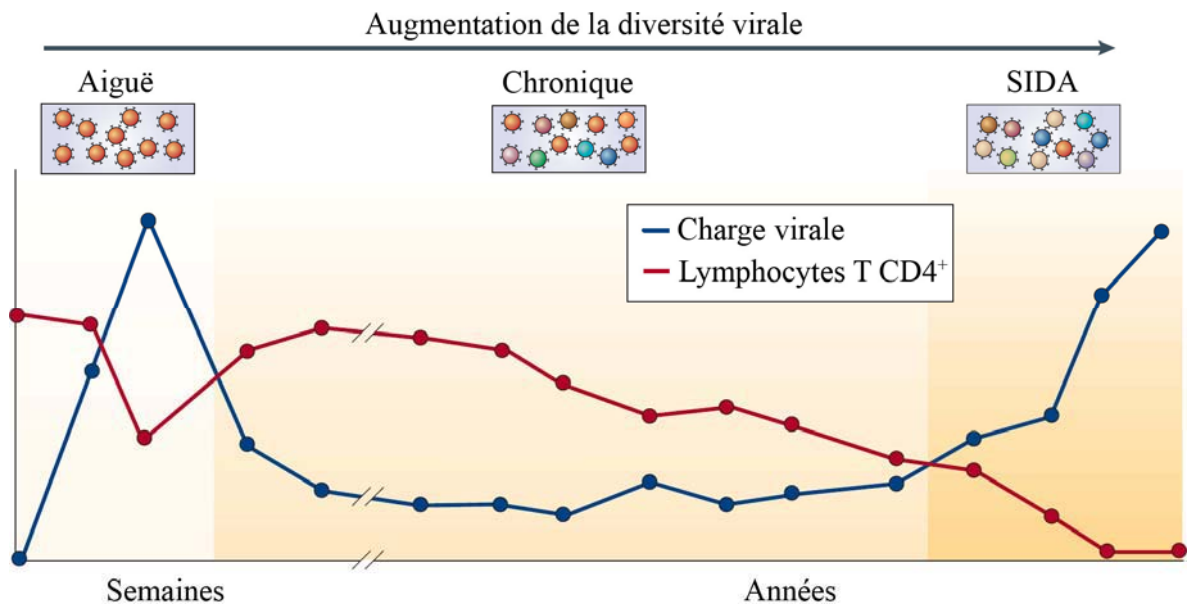


Figure 1.7 : Évolution naturelle de l'infection par le VIH-1, basée sur la charge virale et le compte de lymphocytes T CD4⁺.

Adaptée de Simon et Ho, 2003.

1.9 DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU VIH

Le VIH présente une très grande diversité génétique. Les VIH-1 et VIH-2 constituent les deux espèces du virus. Ils présentent des différences à plusieurs niveaux (Fields, 2001). Principalement, le VIH-2 est moins pathogène que le VIH-1 et il est confiné à l'Afrique de l'Ouest (Kanki et al., 1994).

L'analyse phylogénétique du VIH-1 a permis de mettre en évidence trois groupes : le groupe M (*Main*), le groupe O (*Outlier*) et le groupe N (*non-M, non-O*) (Figure 1.8). Le groupe M comporte la majorité des sous-types qui se sont propagés à travers le monde, tandis que les groupes O et N sont géographiquement restreints à l'Afrique de l'ouest (Simon et al., 1998). Le groupe M est subdivisé en 9 sous-types ou clades (A, B, C, D, F, G, H, J et K) et 43 formes recombinantes circulantes (CRF, *Circulating Recombinant Forms*), dont 2 principales, CRF01-AE (ancien clade E) et CRF02-AG (Robertson et al., 2000; Peeters et al., 2003; HIV Sequence Compendium, 2008).

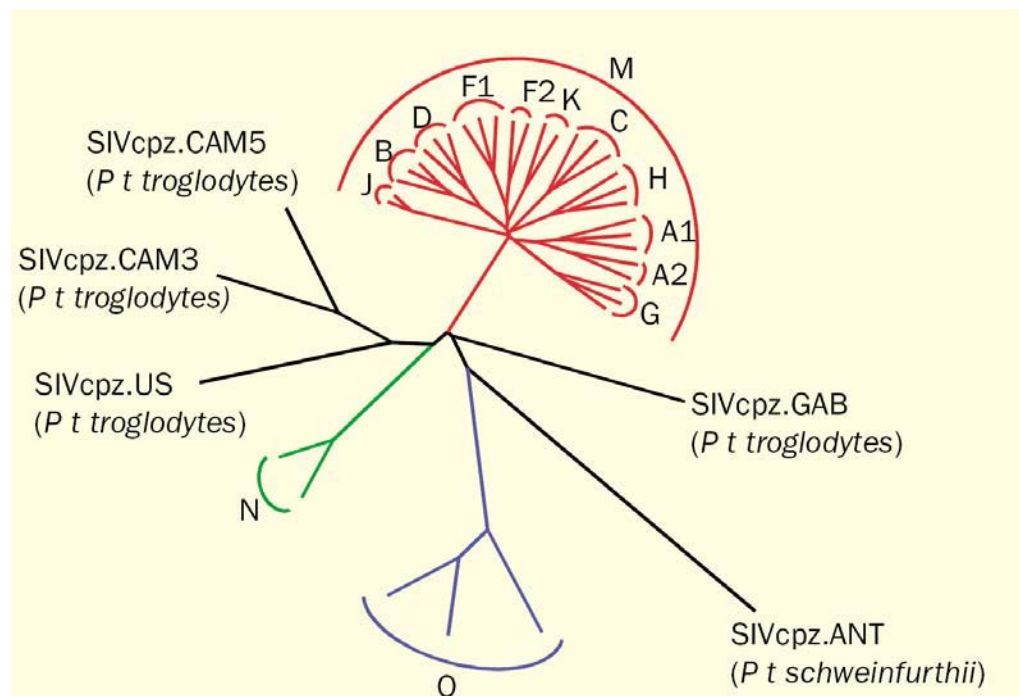


Figure 1.8 : Arbre phylogénétique des groupes M, O et N du VIH-1 et de cinq différents isolats de SIVcpz.

Tirée de Thomson et al., 2002.

Le plus grand nombre de variants différents se retrouve en Afrique centrale (Figure 1.9). Ceci était prévisible étant donné que le virus a une plus longue histoire dans cette région et infecte plus de personnes (Holmes, 2001). En Amérique du Nord et en Europe, le clade B prédomine. Toutefois, ce sont les clades A et C qui causent le plus grand nombre d'infections à travers le monde (McMichael et Rowland-Jones, 2001). De fait, ils sont extrêmement communs en Afrique subsaharienne.



Figure 1.9 : Distribution mondiale des groupes (O et N), des clades et des formes recombinantes circulantes du VIH-1.

Les variants prédominants dans les différentes régions sont indiqués en noir. Modifiée de Thomson et al., 2002.

De plus, le VIH-1 existe chez un même individu sous la forme d'une distribution dynamique de variants génétiquement distincts, mais apparentés, nommée quasiespèce (Meyerhans et al., 1989). La diversité et l'évolution des quasiespèces sont inhérentes à l'infection par le VIH-1 et résultent de plusieurs facteurs. D'abord, la variabilité génétique découle des taux élevés de mutations (approximativement 1 par 10^4 nucléotides) (Mansky et Temin, 1995) et de recombinaison génétique (3 par cycle de réplication) (Zhuang et al., 2002) engendrées par la transcriptase inverse dans le contexte d'une réplication virale intense, estimée à 10^{10} virions produits par jour chez un individu infecté non-traité

(Perelson et al., 1996). Ensuite, l'évolution se produit en réponse à la pression sélective exercée par le système immunitaire, plus précisément les anticorps neutralisants (Wei et al., 2003), les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Ross et Rodrigo, 2002) et les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Phillips et al., 1991; Ogg et al., 1998) et par les agents antirétroviraux, s'il y a lieu (Casazza et al., 2005). Ces facteurs génèrent une population virale hautement hétérogène dont la diversité s'intensifie au fur et à mesure de l'évolution de l'infection (Figure 1.7) (Simone et Ho, 2003).

2 TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH-1

2.1 PRÉVALENCE DE L'INFECTION PAR LE VIH CHEZ LES FEMMES

Le VIH ne frappe plus seulement les hommes comme au tout début de l'épidémie. Aujourd'hui, les femmes représentent dans le monde la moitié des personnes vivant avec le VIH. En Afrique subsaharienne, où l'épidémie est la plus sévère, les femmes représentent près de 60% des adultes infectés par le VIH (Figure 2.1) (ONUSIDA, 2008). La transmission chez les jeunes femmes est aussi une préoccupation majeure puisque globalement, les jeunes femmes âgées de 15 à 24 ans courent un risque de deux à six fois plus élevé d'être infectées que les hommes du même âge (ONUSIDA, 2007).

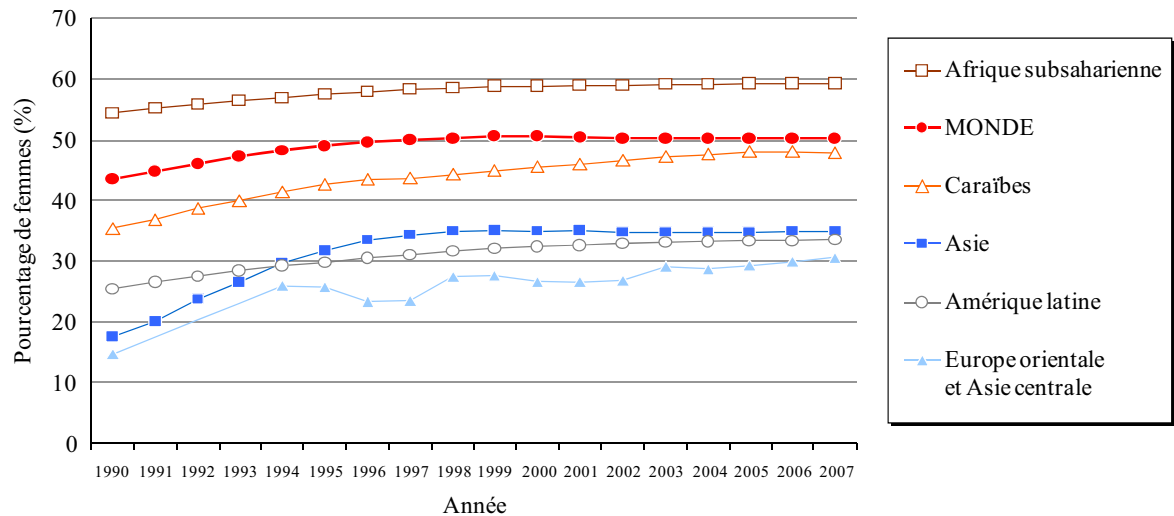


Figure 2.1 : Pourcentage des adultes (15 ans et plus) vivant avec le VIH qui sont des femmes, 1990-2007.

Tiré d'ONUSIDA, 2008.

2.2 IMMUNITÉ MATERNELLE DURANT LA GROSSESSE

Lors de la grossesse, il est critique que la mère tolère la présence du fœtus, qui peut être décrit comme une greffe semi-allogénique du fait des molécules HLA paternelles (Szekeres-Bartho, 2002; Bulla et al., 2004; Poole et Claman, 2004). De fait, le système immunitaire de la femme enceinte subit des modifications importantes, qui sont encore mal

comprises. Toutefois, des évidences montrent qu'il y a un déséquilibre de l'immunité, les réponses T auxiliaires de type 1 (T_H1) étant défavorisées au profit des réponses T_H2 , ce qui protège le développement du fœtus (Wegmann et al., 1993; Marzi et al., 1996; Shimaoka et al., 2000; Wilczyński, 2005). Les lymphocytes T_H1 sécrètent principalement des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-2 (IL-2), l'interféron- γ (IFN- γ) et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et favorisent l'immunité à médiation cellulaire, tandis que les lymphocytes T_H2 sécrètent essentiellement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10, lesquels promeuvent l'immunité humorale.

Il est généralement admis que ce sont les hormones stéroïdiennes sexuelles telles que les œstrogènes, la progestérone et la testostérone, qui favorisent un environnement anti-inflammatoire durant la grossesse (Figure 2.2) (Piccinni, 2003; Poole et Claman, 2004). À cet égard, il est à noter que les maladies intensifiées par des réponses T_H2 , telles que le lupus érythémateux, ne s'améliorent pas ou sont aggravées lors de la grossesse (Petri et al., 1992; Radghupathy, 1997; Clowse et al., 2005), tandis que les symptômes de maladies qui impliquent des réponses inflammatoires, telles que la sclérose en plaques et l'arthrite rhumatoïde, sont parfois améliorés chez les femmes enceintes (vanWalderveen et al., 1994; Confavreux et al., 1998; Barrett et al., 1999; Soldan et al., 2003).

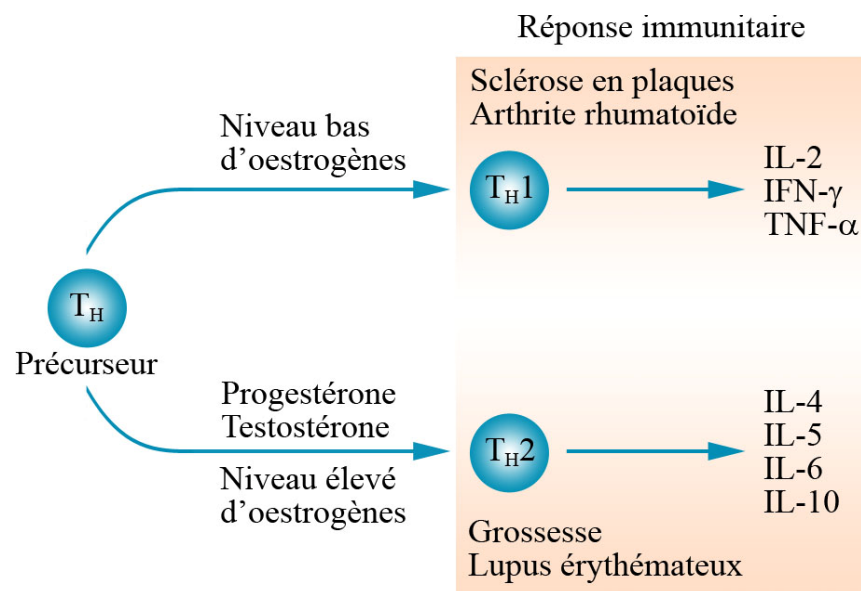


Figure 2.2 : Influence des hormones sur les lymphocytes T auxiliaires.

Inspirée de Whitacre et al., 1999.

2.3 TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH-1

La prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant (TME) est un des enjeux majeurs de la pandémie. De fait, 370 000 enfants de moins de 15 ans ont été infectés par le VIH en 2007, la majorité par la TME (ONUSIDA, 2008). En l'absence de toute intervention, le risque de TME du VIH est d'environ 15%-30% si la mère n'allait pas son nourrisson. En cas d'allaitement prolongé, le risque d'infection peut s'élever jusqu'à 45% (Simpson et al., 2000; De Cock et al., 2000). Cependant, la majorité des enfants qui naissent de femmes infectées par le VIH et non-traitées ne sont pas infectés à leur tour, ce qui indique que certains facteurs affectent la transmission du virus.

2.4 MÉCANISMES DE LA TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH-1

La TME du virus peut survenir à divers moments, soit *in utero*, durant la grossesse par passage transplacentaire, *intra-partum*, au cours du travail et de l'accouchement et *post-partum*, dans le contexte de l'allaitement maternel. Sans prophylaxie antirétrovirale, 20-25% des bébés nés de mères infectées par le VIH-1 sont infectés *in utero*, 40-55% *intra-partum* et 20-25% *post-partum* (Dunn et al., 1992; Ekpini et al., 1997; Leroy et al., 1998; Coutoudis et al., 1999).

2.4.1 Transmission *in utero*

La transmission *in utero* se produit dans les dernières semaines précédant l'accouchement. L'absence quasi constante d'infection précoce *in utero* des fœtus est maintenant bien établie (Rouzioux et al., 1995). Les mécanismes de transmission *in utero* restent encore mal définis. Toutefois, le virus serait sans doute majoritairement transmis par les microtransfusions sanguines materno-fœtales, occasionnées par les contractions utérines et la rupture de la barrière placentaire (Kourtis et al., 2001). De fait, du virus a été isolé du liquide amniotique (Sprecher et al., 1986; Mundy et al., 1987).

2.4.2 Transmission *intra-partum*

La transmission *intra-partum* se produit par les échanges sanguins fœto-maternels durant le travail et par le contact direct de la peau ou des surfaces muqueuses du nouveau-né avec le sang et/ou les sécrétions vaginales lors du passage dans le canal utérin (Gaillard et al.,

2000; Andiman, 2002). Le virus est présent dans les sécrétions vaginales sous forme de cellules CD4⁺ infectées et sous forme de particules virales libres (John et al., 1997)

2.4.3 Transmission *post-partum*

La transmission *post-partum* se produit essentiellement au cours de l'allaitement maternel (Leroy et al., 1998). En fait, l'allaitement contribuerait au risque de transmission orale du virus en raison de la présence de cellules infectées et de particules virales libres dans le lait maternel, mais aussi par la présence concomitante d'une mastite ou du saignement des mamelons (Semba et al., 1999; Baron et al., 2000; Kantarci et al., 2007). Également, il a été montré que l'allaitement mixte (lait maternel combiné à d'autres liquides et solides) peut présenter un plus grand risque de transmission que l'allaitement au sein exclusif (Coutsoudis et al., 1999; 2001; Iliff et al., 2005; Coovadia et al., 2007; Kuhn et al., 2007).

2.5 PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE ASSOCIÉS À LA TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH-1

Un réseau complexe de facteurs intervient sur les différents mécanismes de la TME du VIH-1. Les principaux facteurs de risque sont énumérés au tableau II.

Tableau II: Principaux facteurs de risque associés à la transmission mère-enfant du VIH-1.

Charge virale maternelle élevée
Faible décompte de lymphocytes T CD4 ⁺ chez la mère
Stade avancé de la maladie de la mère
Accouchement par voie vaginale
Infections cervico-vaginales
Chorioamniotite
Durée de la rupture des membranes > 4h
Allaitement
Prématurité du nouveau-né (< 37 semaines de gestation)
Concordance des HLA entre la mère et l'enfant

Adapté de Bulterys, 2001; Andiman, 2002.

La charge virale d'ARN plasmatique de la mère est le facteur prédictif le plus important pour la TME du VIH-1 (Fang et al., 1995; Mayaux et al., 1997; Mofenson et al., 1999; Garcia et al., 1999). Toutefois, il n'y a pas de seuil en dessous duquel le risque est nul et des cas de transmission à l'enfant ont été observés chez des femmes ayant une charge virale inférieure à 50 copies/ml (Ioannidis et al., 2001; European Collaborative Study, 2005).

Le décompte de lymphocytes T CD4⁺ reflète l'état d'avancement du déficit immunitaire de la mère et est associé au risque de transmission (European Collaborative Study, 1992; Sperling et al., 1996). De fait, le risque de transmission augmente significativement lorsque le décompte de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 200 cellules/mm³, ce qui correspond à un des critères du stade SIDA (Mayaux et al., 1995).

L'accouchement par voie vaginale augmente le risque de transmission au nouveau-né tel que décrit précédemment. De plus, le risque est accru en cas de lacérations, d'épisiotomies et d'utilisation d'instruments provoquant des blessures superficielles à l'enfant (forceps et autres) (International Perinatal HIV Group, 1999).

Les infections cervico-vaginales, la chorioamniotite, la rupture prématurée des membranes et l'allaitement maternel accroissent le risque de transmission en augmentant l'exposition de l'enfant au virus (St Louis et al., 1993; International Perinatal HIV Group, 1999; 2001; Coutoudis et al., 2004; Bhoopat et al., 2005).

L'augmentation du risque de transmission en lien avec la prématurité du nouveau-né (< 37 semaines de gestation) viendrait du fait que les mesures pour prévenir la transmission n'ont pu être mises en place (Duran et al., 2007).

La concordance des molécules HLA de classe I entre la mère et l'enfant est associée à un risque élevé de TME du VIH-1 (MacDonald et al., 1998; Polycarpou et al., 2002; Kuhn et al., 2004; Mackelprang et al., 2008). D'abord, les réponses allo-immunitaires de l'enfant dirigées contre les molécules HLA maternelles le protégeraient de l'infection. Ainsi, chez une mère et son enfant partageant seulement trois allèles HLA (discordance), les molécules HLA à la surface des cellules maternelles infectées par le VIH seront possiblement identifiées en tant que «non-soi» par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC) ou les cellules

NK (*Natural Killer*) et seront détruites, ce qui évitera l'infection. Les réponses allo-immunitaires du fœtus ou du nouveau-né peuvent également être dirigées contre les molécules HLA maternelles incorporées dans l'enveloppe du virus. Ensuite, la concordance des molécules HLA implique que les enfants peuvent être incapables de reconnaître un variant VIH-1 qui a échappé à la réponse immune de la mère par l'intermédiaire de la sélection par les molécules HLA (Pillay et Phillips, 2005).

2.6 PRINCIPALES STRATÉGIES POUR LA PRÉVENTION DE LA TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH-1

Les interventions qui ont prouvé leur efficacité à réduire la transmission mère-enfant incluent la césarienne programmée, l'allaitement artificiel, et le traitement antirétroviral (Connor et al., 1994; Sperling et al., 1996; Mofenson, 2002; Rollins et al., 2004). La combinaison de ces mesures préventives a mené à la réduction de l'incidence de la TME à moins de 2% dans les pays industrialisés (Coll et al., 2002; Newell et Thorne, 2004). Malheureusement, ces méthodes demeurent inaccessibles à une grande majorité de femmes enceintes infectées par le VIH dans les pays où les ressources sont limitées et où la prévalence du VIH est élevée.

2.6.1 Césarienne programmée

L'exposition de l'enfant au virus peut être largement réduite par césarienne programmée. L'efficacité de la césarienne à membranes intactes (i.e. avant tout début de travail) à réduire la TME du VIH a été établie. En revanche, le risque de transmission n'est pas diminué en cas de césarienne à membranes rompues ou en cours de travail (The European Mode of Delivery Collaboration, 1999; The International Perinatal HIV Group, 1999; Thorne et Newell, 2004). Dans les régions où la thérapie antirétrovirale à haute activité (HAART) est disponible, l'avantage supplémentaire de la césarienne élective a été remis en cause étant donné le risque de morbidité maternelle et néonatale liée à celle-ci (Stringer et al., 1999; Rowland et al., 2001). Ainsi, les directives actuelles ne suggèrent plus la césarienne pour les mères dont la charge virale est indétectable (Hawkins et al., 2005). À l'inverse, la majorité des mères accouchant dans les pays en développement ne peuvent le faire par césarienne. En effet, celle-ci est associée à une morbidité élevée et requiert un équipement particulier ainsi qu'un personnel qualifié, souvent non-disponibles dans ces régions.

2.6.2 Allaitement

L'allaitement au sein prolongé par des mères infectées par le VIH accroît le risque de transmission du virus au nourrisson. Par conséquent, l'Organisation mondiale de la santé conseille aux mères infectées par le VIH de sevrer leur nourrisson assez rapidement (après 6 mois) pour ne pas prolonger l'exposition de l'enfant et d'éviter l'allaitement mixte. Lorsqu'une alimentation de substitution est possible, on recommande alors que les femmes infectées par le VIH évitent l'allaitement maternel (ONUSIDA, 2008).

Dans les pays industrialisés, le lait en poudre pour nourrisson est un produit de remplacement convenable du point de vue nutritif et sécuritaire en raison de la disponibilité de l'eau potable. Toutefois, dans les pays aux ressources limitées, les préoccupations concernant l'allaitement sont majeures: l'accès au lait en poudre est limité et l'eau potable est rare. Par conséquent, le sevrage précoce et la suppression complète de l'allaitement au sein ne sont pas des solutions applicables. Dans les faits, l'allaitement prolongé en Afrique est une pratique commune (i.e., sevrage à 18-24 mois) et l'allaitement exclusif est rarement pratiqué au-delà des 3-4 premiers mois de vie (Omari et al., 2003; Poggensee et al., 2004).

2.6.3 Prophylaxie antirétrovirale

La plus importante avancée dans la prévention de la TME du VIH-1 s'est produite en février 1994, quand les résultats du protocole 076 du Pediatric AIDS Clinical Trials Group (PACTG) ont montré que le risque de transmission pouvait être réduit de 25% à 8% avec la zidovudine (AZT) administrée à la mère durant la grossesse et lors de l'accouchement et au nouveau-né en *post-partum* (Connor et al., 1994). La thérapie antirétrovirale permet de réduire la charge virale de la mère et de fournir la prophylaxie pré- et post-exposition au bébé (Sperling et al., 1996; Simonds et al., 1998; Ioannidis et al., 2001). Cette dernière est réalisée par le traitement maternel du fait du passage transplacentaire des médicaments et par le traitement post-natal de l'enfant.

2.7 LIMITES DE LA PROPHYLAXIE ANTIRÉTROVIRALE

Malheureusement, les principales stratégies pour prévenir la TME du VIH-1 se heurtent à de nombreux obstacles. La césarienne programmée et l'allaitement artificiel peuvent difficilement être des options dans les pays aux ressources limitées. La thérapie

antirétrovirale semble ainsi être le moyen le plus envisageable pour réduire la transmission materno-fœtale, mais comporte elle aussi des limites.

2.7.1 Accès limité aux antirétroviraux dans les pays en voie de développement

L'accès limité à la thérapie antirétrovirale est en lien avec le coût des traitements et avec l'absence d'infrastructures pour les distribuer adéquatement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (Badri et al., 2006). À l'échelle mondiale, 34% femmes enceintes infectées par le VIH avaient accès au traitement antirétroviral pour prévenir la TME du virus en 2007 (ONUSIDA, 2008). Dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne, ce chiffre chute à moins de 10% (Figure 2.3). Par conséquent, l'accès limité à la thérapie explique en grande partie les 330 000 enfants infectés par le VIH en 2007 en Afrique subsaharienne (ONUSIDA, 2008).

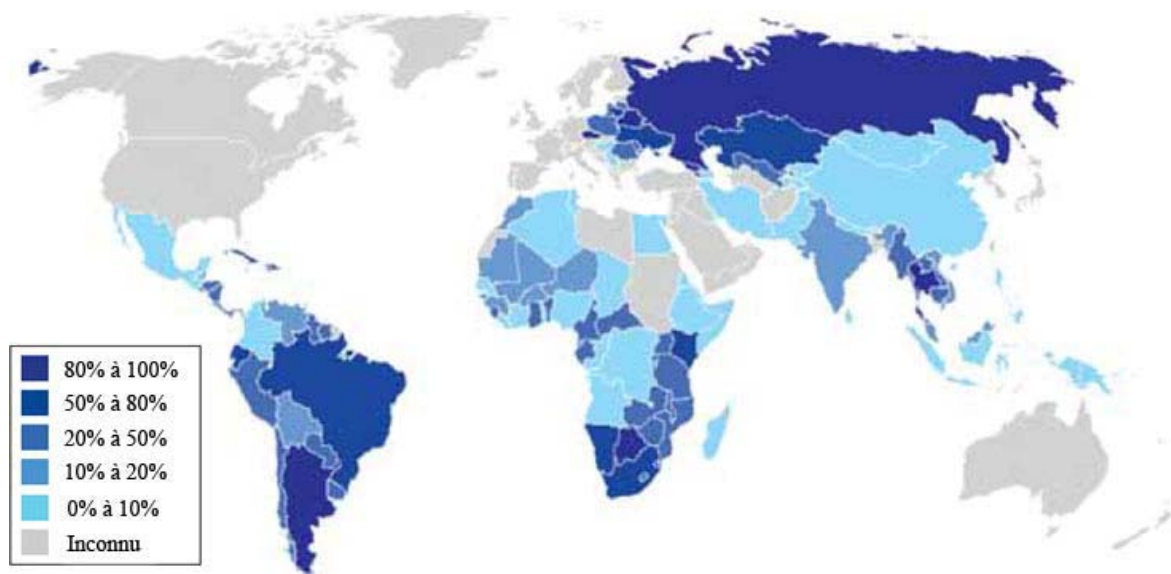


Figure 2.3 : Pourcentage de femmes enceintes infectées par le VIH recevant la prophylaxie antirétrovirale.

Tirée d'ONUSIDA, 2008.

2.7.2 Toxicité des agents antirétroviraux pour la mère et l'enfant

Une étude cumulative recensant la toxicité associée aux antirétroviraux d'études cliniques effectuées en Afrique a conclu que les traitements antirétroviraux, aux doses utilisées, n'étaient pas toxiques pour les mères et leurs enfants (Chigwedere et al., 2008). Étant

donné que les schémas thérapeutiques pour prévenir la TME dans les pays industrialisés sont plus complexes, les conclusions quant à leur toxicité et à leur sécurité à long terme ne sont pas aussi tranchées. Par exemple, des études ont décrit le risque d'un syndrome neurologique lié au dysfonctionnement mitochondrial persistant chez les enfants exposés aux analogues nucléosidiques pendant le période périnatale (Blanche et al., 1999; Barret et al., 2004; Brogly et al, 2007; Côté et al, 2008). Toutefois, ce dysfonctionnement n'a pas été observé dans une étude analogue (The Perinatal Safety Reviews Working Group, 2000). Cependant, sur la base des connaissances actuelles, les effets bénéfiques de la prophylaxie antirétrovirale sont de loin supérieurs à leurs risques potentiels (Thorne et Newell, 2007). Les principaux antirétroviraux utilisés au cours de la grossesse ainsi que leurs effets secondaires sont présentés au tableau III.

Tableau III: Antirétroviraux utilisés pour prévenir la transmission mère-enfant du VIH-1.

Catégorie d'antirétroviraux	Antirétroviraux	Effets secondaires
Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)	Zidovudine (AZT)	Anémie, toxicité mitochondriale (acidose lactique, pancréatite, stéatose hépatique) chez la mère et l'enfant, neuropathie, hypersensibilité
	Lamivudine (3TC)	
	Stavudine (d4T)	
	Didanosine (ddI)	
	Abacavir (ABC)	
	Ténofovir (TNV)	Effet possible sur le métabolisme fœtal osseux
Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)	Névirapine (NVP)	Toxicité hépatique, éruption
Inhibiteurs de la protéase (IP)	Amprenavir (APV)	Hyperglycémie, diabète gestationnel, augmentation possible de prématurité, hépatite
	Atazanavir (AZV)	
	Indinavir (IDV)	
	Lopinavir/ritonavir (rLPV)	
	Nelfinavir (NFV)	
	Ritonavir (RTV)	
	Saquinavir (SQV)	

Adapté de Lorenzi et al, 1998; The European Collaborative Study and the Swiss Mother and Child HIV Cohort Study, 2000; Tuomala et al., 2002; HIV Medicine, 2007.

2.7.3 Résistance du virus aux antirétroviraux

Dans les pays industrialisés, la HAART exige des patientes de suivre des régimes complexes avec des effets secondaires et des toxicités à long terme, ce qui peut alternativement mener à la non-adhérence (Osterberg et Blaschke, 2005). La non-adhérence peut miner le traitement, menant à l'émergence de virus résistants aux antirétroviraux (Welles et al., 2000).

Dans les pays où les ressources sont limitées, le traitement prolongé et l'injection intraveineuse pendant le travail et l'accouchement rendent les schémas thérapeutiques basés sur le protocole PACTG076 impraticables. Par conséquent, ces dernières années, les projets de prévention de la TME dans ces pays ont été principalement axés sur la distribution de régimes d'antirétroviraux de courte durée, typiquement AZT, NVP ou 3TC (ONUSIDA, 2008). Jusqu'à maintenant, le régime de NVP est le plus simple et le plus abordable. Il consiste en une dose à la mère lors du travail et une dose au nouveau-né dans les 3 jours suivant la naissance (Bassett, 2001; Sripipatana et al., 2007). Il a été montré que ceci abaisse de plus de 40% le risque de TME du VIH-1 (Jackson et al., 2003). Cependant, des études indiquent que les femmes qui reçoivent une dose unique de NVP pour prévenir la TME risquent de développer une résistance au médicament. Ceci peut compromettre l'efficacité des antirétroviraux prescrits plus tard, autant chez la mère que chez l'enfant, s'il s'avère être infecté par un virus résistant (Jourdain et al., 2004). En effet, 32% des femmes recevant la NVP ont montré des mutations de résistance aux INNTI à 10 jours *post-partum* (Jourdain et al., 2004) et ces mutations pourraient être présentes chez 46% des nouveau-nés infectés (Eshleman et al., 2001). Des résistances à l'AZT et au 3TC dans le contexte de la TME ont également été rapportées (De Jose et al., 2001; Johnson et al., 2001). Même si les avantages de la dose unique d'un agent antirétroviral sont supérieurs au risque de résistance dans les situations où les ressources sont limitées, la mise au point de nouvelles stratégies pouvant être implantées dans ce contexte constitue une priorité mondiale.

3 LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES ET VIH-1

3.1 MÉCANISME D'ACTION DES LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES

Les lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ (LTC) ont plusieurs activités antivirales; ils sont en mesure de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées et de produire des cytokines et des chimiokines lors de l'infection par le VIH (Figure 3.1).

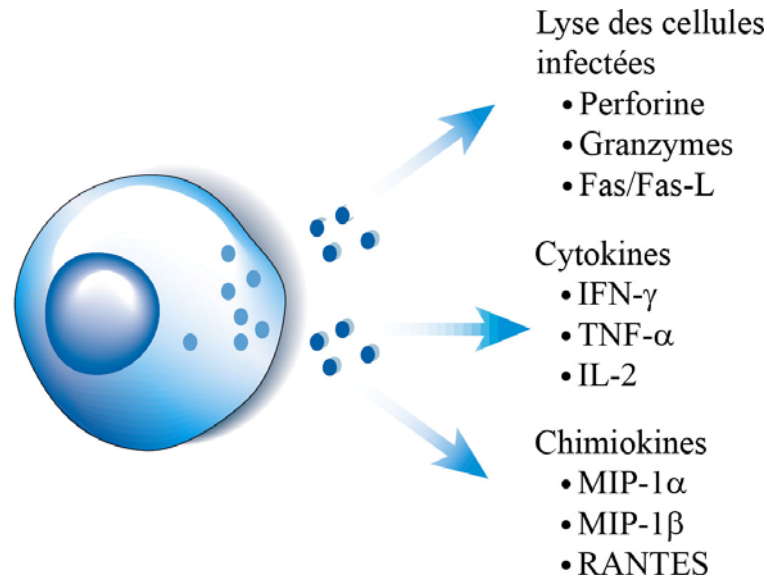


Figure 3.1 : Activités antivirales des LTC VIH-spécifiques.

Modifiée de McMichael et Rowland-Jones, 2001.

3.1.1 Reconnaissance antigénique

Le lymphocyte T exprime à sa surface le récepteur des cellules T (TCR), qui se lie spécifiquement au complexe formé d'un peptide antigénique et d'une molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), aussi appelée *human leukocyte antigen* (HLA). Il existe des molécules de CMH de classe I (CMH-I) et de classe II (CMH-II). Les molécules de CMH-I sont exprimées sur toutes les cellules nucléées et présentent les peptides (8-10 acides aminés) dérivés des protéines endogènes au TCR des cellules T $CD8^+$ (Figure 3.2A). Contrairement à l'expression ubiquitaire du CMH-I, les molécules de CMH-II sont exprimées essentiellement à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC)

professionnelles, plus précisément les cellules dendritiques, les cellules B et les macrophages. Elles peuvent cependant être induites chez la majorité des cellules par l'IFN- γ (Ting et Trowsdale, 2002). Les molécules de CMH-II sont spécialisées dans la présentation des antigènes exogènes au TCR des cellules T CD4⁺ (Jensen, 2007; Vyas et al., 2008).

En plus de la voie classique où les molécules de CMH-I présentent les antigènes d'origine intracellulaire, il existe une voie alternative où les molécules de CMH-I présentent des antigènes exogènes (Brossart et Bevan, 1997; Reimann et Kaufmann, 1997). Cette voie, nommée présentation croisée, est probablement limitée aux APC professionnelles. Ces cellules internalisent les antigènes exogènes par la voie endocytaire et présentent les peptides par les molécules de CMH-I aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Figure 3.2B) (Groothuis et Neefjes, 2005; Shen et Rock, 2005).

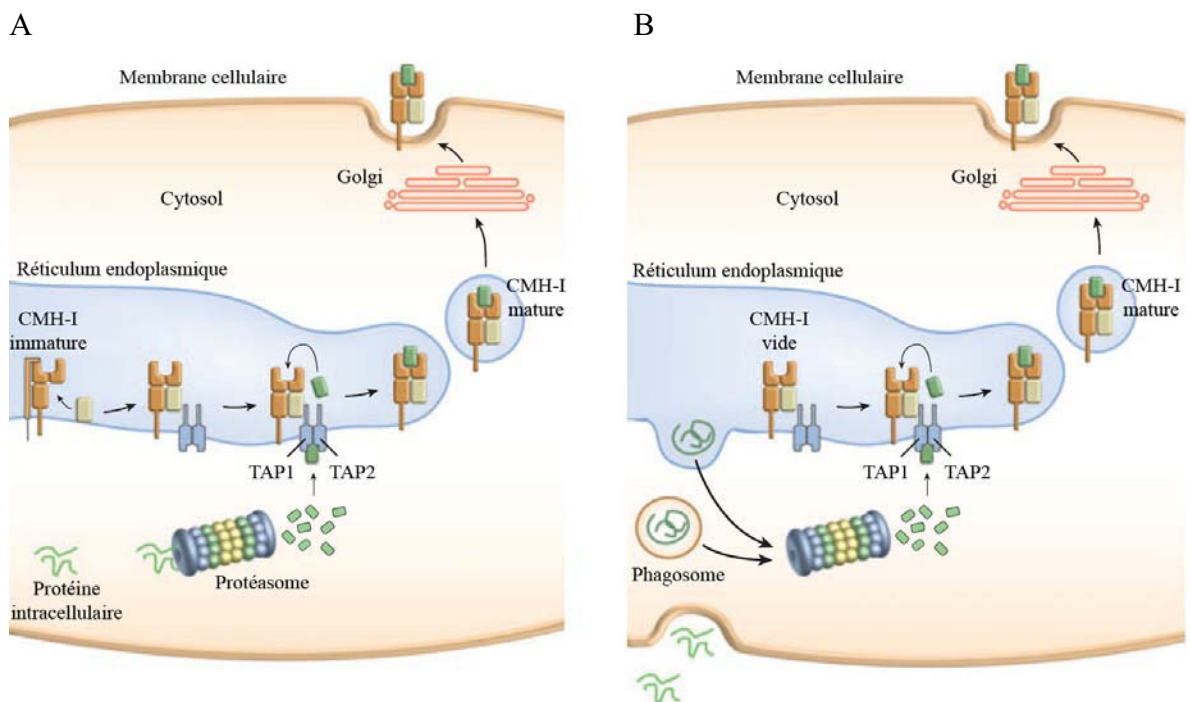


Figure 3.2 : Apprêtement et présentation antigéniques par les molécules de CMH-I.

A : En général, les peptides présentés par les molécules de CMH-I sont dérivés des protéines intracellulaires. B : Alternativement, les protéines exogènes peuvent aussi être présentées par les molécules de CMH-I lors de la présentation croisée. Adaptée d'Andersen et al., 2006.

3.1.2 Activités antivirales

Les LTC spécifiques au VIH entraînent la destruction des cellules infectées par le virus par les cytotoxines (perforines et granzymes) ou par le ligand de Fas (Fas-L) (Figure 3.1) (Kägi et al., 1994; Nagata et Golstein, 1995; Smyth et Trapani, 1995; Shankar et al., 1999). De plus, les LTC spécifiques au VIH sécrètent des cytokines et des chimiokines, lesquelles ont un effet antiviral (Figure 3.1). Ces cytokines sont essentiellement l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2 (Jassey et al., 1993; Sandberg et al., 2001; Zimmerli et al., 2005). Ces chimiokines sont MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES, lesquelles sont des ligands de CCR5, le corécepteur des souches R5 du VIH. Par conséquent, ces chimiokines lient CCR5, bloquent directement et/ou indirectement l'entrée du virus et ainsi inhibent la réplication virale (Cocchi et al., 1995).

3.2 LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES ET LE CONTRÔLE DE LA RÉPLICATION DU VIH-1

Plusieurs évidences montrent que les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont importants pour le contrôle de la réplication du VIH-1 (Musey et al., 1997; Brodie et al., 1999). D'abord, l'émergence d'une réponse LTC VIH-spécifique corrèle temporairement avec le déclin initial de la virémie au cours de l'infection aiguë (Figure 3.3) (Koup et al., 1994, Borrow et al., 1994). Ensuite, le rôle crucial des LTC est suggéré par l'association entre de fortes réponses LTC spécifiques au virus et la progression lente de la maladie (Pantaleo et al., 1995; Ogg et al., 1998) et, aussi, par la génération de mutants VIH *in vivo* qui ne sont plus reconnus par les LTC et qui échappent donc à leur contrôle (Phillips et al., 1991; Borrow et al., 1997; McMichael et Rowland-Jones, 2001). De plus, l'implication des LTC est fortement appuyée par des études chez le macaque rhésus infecté par le VIS. En effet, lors de la déplétion des cellules T CD8⁺ par des anticorps, la virémie augmente nettement et est par la suite contrôlée lorsque la population CD8 est restaurée (Matano et al., 1998; Jin et al., 1999; Schmitz et al., 1999). Finalement, l'importance des LTC est également démontrée par le fait que des haplotypes particuliers de CMH-I sont associés aux différences de susceptibilité à l'infection. En effet, les molécules HLA liées à la progression lente de l'infection, tels que HLA-B27 et HLA-B57, pourraient stimuler des réponses immunitaires VIH-spécifiques plus efficaces comparées à celles des molécules HLA qui confèrent une susceptibilité accrue à l'infection, tel que HLA-B35 (Kaslow et al., 1996; Carrington et al.,

1999). De même, l'homozygotie des molécules HLA de classe I, qui est également associée à une progression plus rapide de l'infection, procurerait moins d'occasions pour une réponse T diversifiée (Carrington et al., 1999).

3.3 LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES AU COURS DE L'ÉVOLUTION DE L'INFECTION PAR LE VIH-1

Lors de la phase aiguë de l'infection, il y a une forte réponse LTC spécifique au virus (10% de toutes les cellules T CD8⁺), temporellement associée au contrôle partiel de la réplication virale, qui est observée chez l'humain et clairement démontrée chez le singe (Figure 3.3) (Pantaleo et al., 1994; Butz et Bevan, 1998; Kuroda et al., 1999; Wilson et al., 2000).

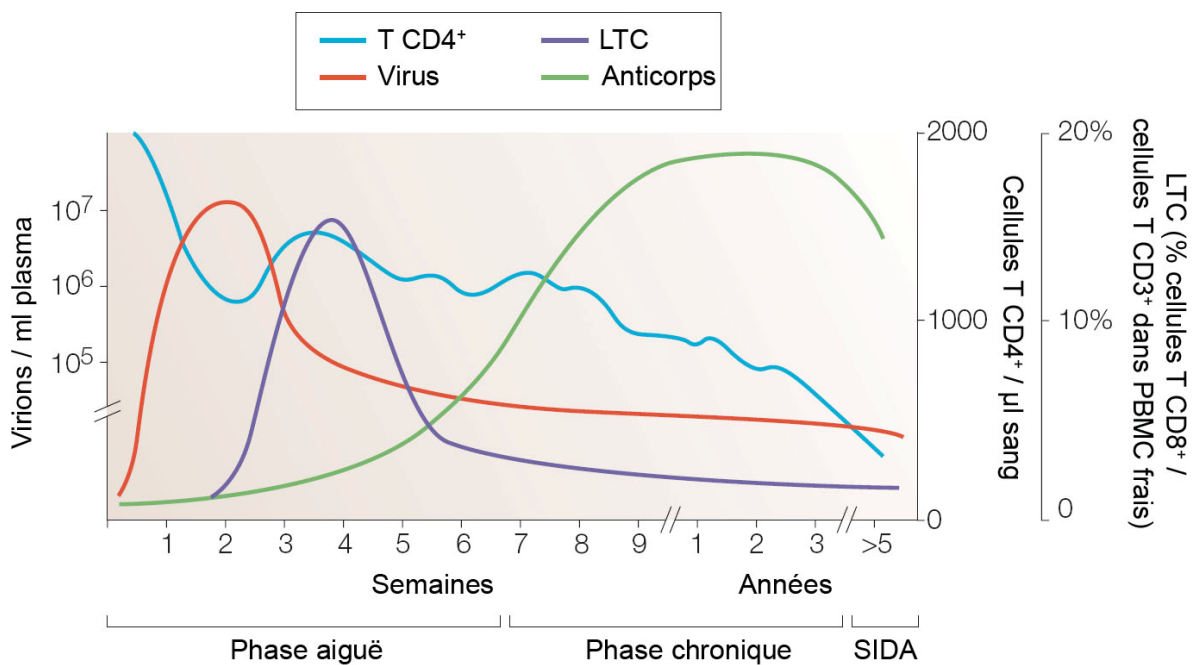


Figure 3.3 : Dynamique de l'immunité acquise au cours de l'infection par le VIS.

Les courbes de la charge virale (rouge), des LTC (violet), des cellules T CD4⁺ (bleu) et des anticorps (vert) au cours de l'infection par le SIV sont sensiblement les mêmes lors de l'infection par le VIH-1. Adaptée de Goulder et Watkins, 2004.

Pendant l'infection chronique, des fréquences relativement élevées de LTC VIH-spécifiques sont maintenues chez les individus infectés qui sont restés asymptomatiques pendant des années (Altman et al., 1996; Ogg et al., 1998; Gea-Banacloche et al., 2000).

Plusieurs études ont montré une corrélation négative entre la charge virale et la fréquence des LTC VIH-spécifiques au cours de l'infection chronique (Ogg et al., 1998; Betts et al., 2001). Cependant, les LTC VIH-spécifiques ne peuvent empêcher l'immunodéficience progressive chez la majorité des sujets infectés par le VIH-1 (Lieberman et al., 2001). De fait, ils peuvent encore être clairement détectables quand le SIDA se développe (McMichael et Rowland-Jones, 2001).

3.4 PRINCIPAUX MÉCANISMES PAR LESQUELS LE VIH-1 ÉCHAPPE À LA RÉPONSE DES LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES

En dépit de la réponse LTC, la réplication virale n'est jamais complètement annihilée. De fait, plusieurs facteurs affectent la réponse LTC spécifique au VIH et permettent ainsi au virus d'échapper à leur contrôle. La latence représente la forme la plus efficace d'évasion du système immunitaire par le virus. En effet, les provirus n'engendrent pas d'antigènes viraux et échappent ainsi à la surveillance par les LTC (McCune, 1995). En plus, ils sont insensibles aux antirétroviraux. Ensuite, le VIH possède une extraordinaire capacité à muter, décrite à la section 1.9. Ainsi, la mutation d'épitopes LTC suite à la pression sélective exercée par les LTC VIH-spécifiques permet au virus d'échapper à leur reconnaissance (Phillips et al., 1991; Borrow et al., 1997; Goulder et al., 1997; Price et al., 1997; Moore et al., 2002; Brumme et al., 2007; 2008). Toutefois, certaines mutations d'épitopes LTC diminuent la robustesse du virus (Wolinsky et al., 1996). Aussi, d'autres stratégies permettent au virus d'échapper aux réponses LTC dirigées contre les régions relativement conservées du virus. Ainsi, le moyen le plus efficace par lequel le VIH affecte le système immunitaire est par la déplétion des lymphocytes T CD4⁺. Ceci entraîne entre autre la détérioration des réponses LTC. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires sont importants pour le *priming* et la maturation des réponses T CD8⁺ et pour le maintien des LTC mémoires (Walter et al., 1995; Zajac et al., 1998; Kalams et Walker, 1998; Ridge et al., 1998; Agnellini et al., 2008). Les LTC qui persistent en l'absence d'une aide adéquate par les cellules T CD4⁺ peuvent ainsi être inefficaces *in vivo* (Hay et al., 1999; McMichael et Rowland-Jones, 2001). Ce phénomène est observé chez les individus qui progressent rapidement vers le SIDA, mais pas chez ceux qui contrôlent efficacement la réplication virale (Migueles et al., 2002). De plus, la régulation négative de l'expression des molécules de CMH-I, HLA-A et HLA-B, à la surface des cellules infectées par la protéine virale Nef

diminue la reconnaissance par les LTC et limite ainsi leur effet antiviral (Schwartz et al., 1996; Collins et al., 1998). La régulation positive de l'expression du ligand de Fas sur les cellules infectées est une autre conséquence de l'activité de Nef (Xu et al., 1997; 1999; Muthumani et al., 2005). Presque toutes les cellules T VIH-spécifiques expriment Fas à leur surface et ainsi peuvent subir l'apoptose par la voie Fas/Fas-L (McMichael et Rowland-Jones, 2001). Finalement, un certain nombre de données indiquent que les LTC VIH-spécifiques isolés d'individus infectés par le VIH sont fonctionnellement anormaux (Pantaleo et al., 1990). Le dysfonctionnement des cellules T CD8⁺ VIH-spécifiques *in vivo* inclut a) l'épuisement clonal (*clonal exhaustion*) des LTC ayant subi une expansion lors de l'infection primaire (Moskophidis et al., 1993; Pantaleo et al., 1997; Oxenius et al., 1998; Plesa et al., 2008); b) l'expression de PD-1 (pour *programmed death-1*) (Trautmann et al. 2006; Petrovas et al. 2006; Day et al. 2006); c) l'état d'immaturation des cellules T CD8⁺ (Hamann et al., 1997; Champagne et al., 2001); et d) la sénescence (Dagarag et al., 2003; Papagno et al., 2004). Ceci se traduit concrètement par des LTC ayant une faible expression de perforine et donc une cytotoxicité réduite, ainsi qu'un phénotype CD27⁺CD28⁻ correspondant à une différenciation incomplète chez les sujets infectés par le VIH-1 et non-traités (Appay et al., 2000; 2002). Ces principaux mécanismes sont étroitement liés et engendrent la perte de contrôle des LTC sur la réplication du VIH-1.

3.5 EFFET DE LA PROPHYLAXIE ANTIRÉTROVIRALE SUR LES LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES VIH-SPÉCIFIQUES

L'évolution de l'infection par le VIH est profondément modifiée par les antirétroviraux. En effet, l'initiation de la HAART induit généralement une diminution drastique de la charge virale ainsi qu'une augmentation du compte de lymphocytes T CD4⁺. Ceci entraîne jusqu'à un certain point la restauration du système immunitaire chez la majorité des patients traités (Autran et al., 1997; Li et al., 1998).

Plusieurs études ont démontré la diminution progressive du nombre de LTC VIH-spécifiques en lien avec la réduction de la charge virale provoquée par l'initiation de la thérapie antirétrovirale, et spécialement de la HAART (Gray et al., 1999; Kalams et al., 1999; Ogg et al., 1999). Cette diminution pourrait être due à la perte de la stimulation antigénique requise pour l'expansion et la persistance des LTC VIH-spécifiques au cours de

l'infection chronique. De plus, cette diminution engendrée par la HAART a été également associée à la réduction globale de l'oligoclonalité des LTC VIH-spécifiques, c'est-à-dire l'augmentation de la complexité des populations LTC (Soudeyns et al., 2000). Par ailleurs, des données montrent que l'activité antivirale des LTC VIH-spécifiques est partiellement altérée chez les individus sous traitement antirétroviral (Seth et al., 2001; Trabattoni et al., 2004). En effet, leur activité cytolytique serait réduite par la faible expression de perforine et de granzymes, à cause de l'interférence directe des agents antirétroviraux avec leur synthèse. Ceci contribuerait en partie à la détérioration de la réponse LTC observée chez les patients sous HAART (Trabattoni et al., 2004). Toutefois, ces résultats doivent absolument être confirmés par d'autres groupes.

3.6 LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES ET LA TRANSMISSION MÈRE-ENFANT DU VIH-1

Le principal facteur de risque pour la TME est une charge virale maternelle élevée. Étant donné que les CTL sont importants pour le contrôle du VIH et qu'ils sont détectés dans les sécrétions cervicales ainsi que dans le lait maternel, ils constituent certainement un facteur préventif pertinent dans la transmission materno-foetale (Musey et al., 1997; McMichael et Rowland-Jones, 2001; Sabbaj et al., 2002).

Seulement quelques études ont été entreprises pour définir le rôle de la réponse LTC VIH-spécifique dans la TME. Ainsi, la réponse LTC VIH-spécifique s'avère plus forte chez les mères qui ne transmettent pas le VIH à leur enfant que chez celles qui le transmettent. En effet, des fréquences plus élevées de précurseurs LTC contre les protéines Nef et Pol du VIH-1 et une suppression augmentée de la réplication virale par les LTC VIH-spécifiques sont détectées chez les mères qui ne transmettent pas, comparativement à celles qui transmettent (Jin et al., 1998; Plaeger et al., 1999).

Par ailleurs, des LTC VIH-spécifiques ont été détectés plus souvent chez des enfants exposés et non-infectés que chez des enfants infectés par la TME (Cheynier et al., 1992; Rowland-Jones et al., 1993; De Maria et al., 1994). De plus, des variants échappant à la réponse LTC peuvent être transmis de la mère à l'enfant (Goulder et al., 2001; Pillay et al.,

2005; Sanchez-Merino et al., 2005). Ces virus sont fréquemment détectés chez les mères qui transmettent le virus (Wilson et al., 1999).

De plus, des études ont détecté des réponses LTC dans le lait maternel de femmes infectées par le VIH-1 dirigées contre les protéines Gag, Env, Pol et Nef (Sabbaj et al., 2002; Lohman et al., 2003). Ces réponses étaient de plus grande amplitude dans les échantillons de lait comparativement à celles dans les échantillons de sang, ce qui suggère que des cellules VIH-spécifiques puissent être sélectivement transportées aux glandes mammaires pour réduire la réplication virale et/ou pour prévenir la transmission par le lait maternel (Lohman et al., 2003).

3.7 DÉVELOPPEMENT D'UN VACCIN CONTRE LE VIH-1

La mise au point de vaccin est facilitée par la connaissance des corrélats de protection. De fait, l'immunité acquise, y compris les anticorps neutralisants et les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ virus-spécifiques, sont les principaux corrélats de protection pour la plupart des infections virales (Pantaleo et Koup, 2004). Dans le cas du VIH-1, les études d'immunisation passive et de déplétion immunitaire chez les modèles animaux suggèrent fortement qu'autant les anticorps neutralisants que les réponses de l'immunité à médiation cellulaire, particulièrement celles des LTC et des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, puissent assurer une protection efficace contre l'infection par le VIH-1 et contre la progression de la maladie (Emini et al., 1992; Matano et al., 1998; Jin et al., 1999; Schmitz et al., 1999; Mascola, 2003). En principe, les anticorps neutralisants sont efficaces pour bloquer les particules virales, mais peu efficaces contre les cellules infectées par le virus. Cependant, les anticorps peuvent également agir en collaboration avec des cellules douées d'un potentiel cytotoxique telles que les cellules NK, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles, afin de détruire les cellules infectées par un processus dénommé cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC pour *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Les LTC quant à eux sont efficaces contre les cellules infectées par le virus, mais ne le sont pas contre les virions libres. Toutefois, ni les anticorps ni les LTC ne sont efficaces contre les cellules infectées de façon latente (provirus) (Figure 3.4).

Il est important de souligner qu'aucune de ces réponses n'a d'une manière concluante protégée des individus contre l'infection par le VIH (Fields, 2001). Par conséquent, d'autres corrélats de protection restent à identifier.

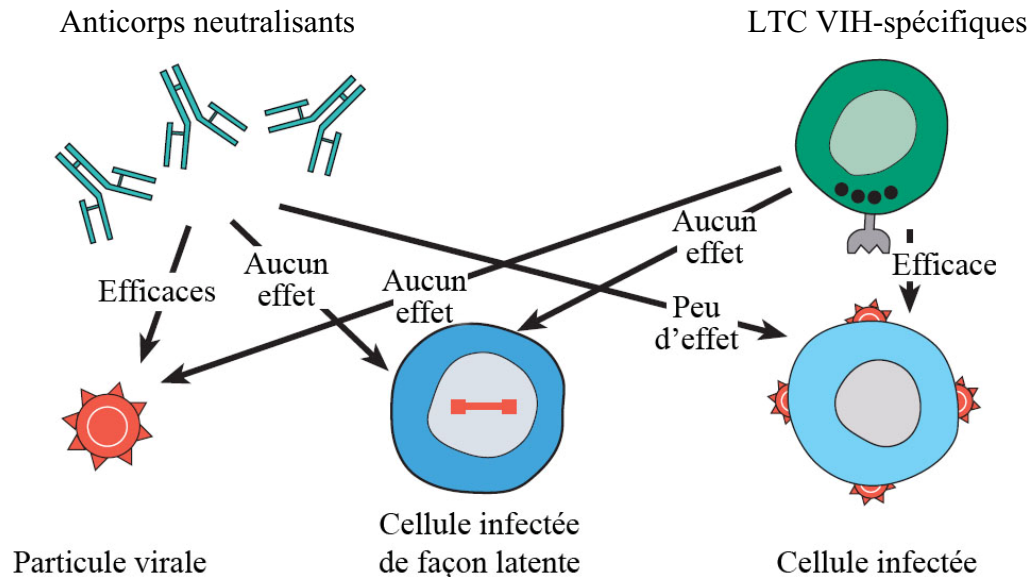


Figure 3.4 : Représentation schématique de l'efficacité des réponses de l'immunité acquise contre les différentes formes de VIH-1.

Adaptée de Pantaleo et Koup, 2004.

Les progrès dans le développement d'un vaccin efficace ont été ralentis par l'absence d'un petit modèle animal reproduisant la pathogenèse du VIH. Toutefois, les souris humanisées se sont révélées récemment d'excellents modèles pour l'infection par le VIH (Berges et al., 2006; 2008). Un autre obstacle majeur est le niveau important d'hétérogénéité génétique des souches du VIH à l'intérieur et entre les clades. En effet, la protection contre une souche ne garantit nullement la protection contre une autre souche apparentée.

Plusieurs vaccins pourraient être utiles contre le VIH-1, y compris ceux qui évitent l'infection d'un individu (immunoprophylaxie) aussi bien que ceux qui ne protègent pas contre l'infection, mais protègent contre le développement de la maladie après l'infection (immunothérapie). De fait, les réponses LTC engendrées par le vaccin pourraient éventuellement arrêter l'infection avant qu'elle soit établie et qu'elle cause des dommages importants à l'immunité, ou contenir le virus à un niveau bas sans toutefois l'éliminer,

réduisant de ce fait l'incidence de la maladie et de la transmission (McMichael et Rowland-Jones, 2001).

3.7.1 Développement d'un vaccin pour prévenir la transmission mère-enfant du VIH-1

L'apparition de résistance aux antirétroviraux et leur toxicité à long terme, ainsi que l'accès limité à la thérapie antirétrovirale dans les pays en voie de développement signifient que des approches alternatives doivent être développées.

L'immunothérapie de la mère dans le contexte de la transmission materno-fœtale serait une solution attrayante. En effet, un vaccin thérapeutique devrait permettre l'activation de l'immunité humorale et de l'immunité à médiation cellulaire chez la mère. Des niveaux importants d'anticorps neutralisants VIH-spécifiques maternels à large spectre seraient transmis de la mère à l'enfant du fait de leur passage transplacentaire et de leur présence dans le lait maternel, et apporteraient une protection transitoire contre l'infection pour l'enfant. L'immunisation active de la mère susciterait quant à elle une forte immunité protectrice contre la progression de la maladie, en présence ou non d'agents antirétroviraux. Ce vaccin réduirait assurément le risque de TME du VIH-1.

Jusqu'à maintenant, peu d'essais d'immunothérapie chez les femmes enceintes infectées par le VIH-1 pour prévenir la TME ont été effectués et les résultats n'ont pas été concluants. L'immunisation active avec des plasmides d'ADN a été effectuée chez deux chimpanzés gestantes et des réponses cellulaires et humorales ont été observées tant au niveau systémique que mucosal (Bagarazi et al., 1999). Des études d'immunisation des femmes enceintes avec des glycoprotéines d'enveloppe recombinantes ont été effectuées et aucune protection contre la TME du VIH-1 n'a été observée en dépit du succès des tests d'innocuité (Lambert et al., 1998, Wright et al., 1999). En combinaison avec la thérapie antirétrovirale, l'immunothérapie pourrait potentiellement être utilisée pour empêcher la TME du VIH-1. Cependant, ceci exigerait une meilleure compréhension de la modulation de l'immunité VIH-spécifique maternelle par la grossesse et par la thérapie antirétrovirale, ce qui est l'objectif principal de l'article présenté.

RATIONNEL ET HYPOTHÈSE

Le VIH peut se transmettre de la mère à l'enfant durant la grossesse et la période périnatale. De fait, la TME du VIH-1 est un des enjeux majeurs de la pandémie (ONUSIDA, 2008). Il existe des méthodes efficaces pour prévenir la TME, principalement la prophylaxie antirétrovirale. Malheureusement, celles-ci demeurent inaccessibles à une grande majorité de femmes infectées par le VIH-1 dans les pays en voie de développement (Fauci, 2007). Il faut par conséquent optimiser les stratégies d'intervention pour réduire la TME afin qu'elles soient utilisées à travers le monde. De fait, l'optimisation de telles stratégies requiert une meilleure compréhension de la réponse immunitaire VIH-spécifique durant la grossesse.

Généralement, il est admis que l'immunité spécifique à médiation cellulaire est impliquée dans la résistance de l'hôte au VIH (McMichael et Rowland-Jones, 2001). Cette immunité de la mère joue un rôle important dans la prévention de la TME. En effet, la transmission materno-fœtale du VIH-1 a été associée entre autres à une faible réponse LTC VIH-spécifiques et à une faible activité suppressive par les lymphocytes T CD8⁺ (Jin et al., 1998; Plaeger et al., 1999). De plus, l'effet de plusieurs maladies à composantes immunitaires change au cours de la grossesse (Mecacci et al., 2007). Cela sous-entend que l'immunité maternelle est modulée durant cette période.

Notre hypothèse de recherche est que l'initiation et la progression de la grossesse modulent les réponses LTC dirigées contre le VIH-1. En d'autres mots, notre objectif est de caractériser l'amplitude et la diversité de la reconnaissance antigénique des LTC VIH-spécifiques avant, pendant et après la grossesse chez des femmes infectées par le VIH-1.

Par conséquent, ce projet porte sur l'impact de la grossesse sur les LTC VIH-spécifiques chez 15 femmes infectées chroniquement par le VIH-1, qui ont eu une ou deux grossesses et qui ont été traitées au moyen d'agents antirétroviraux pour leur santé et pour prévenir la TME. Elles font partie de la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA du CHU Sainte-Justine. La reconnaissance antigénique des LTC a été évaluée par *enzyme linked immunospot* (ELISpot) IFN- γ sur des échantillons de cellules mononuclées du sang périphérique appauvris en CD4, obtenus avant, pendant et après la grossesse. Les cellules ont été stimulées avec des pools de peptides synthétiques correspondant aux séquences de

Gag, ce qui a permis de tester un grand nombre de peptides tout en respectant le volume de sang qui peut être éthiquement obtenu de patientes enceintes.

Ces travaux nous aideront à mieux comprendre l'évolution de l'immunité antivirale lors de l'initiation et durant la progression de la grossesse. Ceci pourra éventuellement améliorer les méthodes destinées à prévenir la transmission du VIH de la mère à l'enfant.

Ce projet est connexe à un précédent projet mené par Sandra B. Akouamba. Ce dernier compose la première partie de l'article présenté.

ARTICLE

Contribution personnelle à l'article

Bertine S. Akouamba a effectué les tests de cytotoxicité sur les échantillons de 11 patientes et écrit une première version du manuscrit. Pour ma part, j'ai effectué les essais ELISpot sur les échantillons des 15 autres patientes et modifié le manuscrit. En effet, j'ai combiné les données des 26 femmes (Tableau I et Figure 1), j'ai ajouté mes résultats (Tableau II, Figures 5 à 8) et j'ai complété les sections introduction, matériel, discussion et conclusion du manuscrit. Par conséquent, Bertine S. Akouamba et moi-même sommes conjointement les deux principales auteures de cet article en préparation.

Longitudinal study of HIV-specific cytotoxic T lymphocyte activity during pregnancy.

Elyse Jolette^{1,2}, Bertine S. Akouamba^{1,2}, Johanne Samson³, Normand Lapointe^{3,4}, Marc Boucher^{3,5}, and Hugo Soudeyns^{1,2,4}.

¹Unité d'immunopathologie virale and ³Centre maternel et infantile sur le SIDA, CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; ²Department of microbiology and immunology, ⁴Pediatrics, and ⁵Obstetrics & Gynecology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Corresponding Author: Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Room 6735, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.

Tel.: (514) 345-4931 ext. 3907

Fax: (514) 345-4794

e-mail: hugo.soudeyns@recherche-ste-justine.qc.ca

ABSTRACT

To better understand maternal HIV-specific immunity and its possible interaction with antiretroviral therapy (ART), a longitudinal assessment of the antigenic specificity and precursor frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) was performed in 26 pregnant women infected with HIV-1, including 9 who were followed during consecutive pregnancies. Overall, HIV-specific CTL precursor frequency was negatively correlated with CD4 and CD8 counts and was reduced in the presence of treatment. HIV-1 viral load was higher in pregnancies where Gag was the HIV-1 antigen most frequently recognized by CTL. Differences in the hierarchy of HIV-1 antigenic recognition by CTL were positively correlated with the duration of the inter pregnancy interval (IPI). Finally, initiation and progression of pregnancy were not associated with significant changes in the magnitude and breadth of Gag-specific CTL responses. These results indicate that: a) pregnant HIV-infected women generate robust HIV-specific CTL responses that are inconsistent with a broad dysfunction of cell-mediated immunity; b) ART is associated with a decline in the magnitude of HIV-specific CTL responses during pregnancy; and c) evolution of CTL responses during the IPI is characterized by changes in the hierarchy of antigenic recognition but not by variations in the breadth and/or magnitude of these responses.

ACKNOWLEDGEMENTS

E.J. and B.S.A. contributed equally to this work. The authors wish to thank study participants, as well as Martine Caty, Silvie Valois, Ampha Khammy, and François Maurice for expert technical assistance, and Doris G. Ransy, Mathieu Quesnel-Vallières, and Natacha Merindol for critical reading of the manuscript. Supported by grants from the CIHR-Health Canada Research Initiative on HIV-AIDS (grant n° HOP-75352) and by an infrastructure grant from le Réseau SIDA-maladies infectieuses of le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). B.S.A. was the recipient of a Graduate Scholarship from le Ministère de l'éducation du Gabon.

NONSTANDARD ABBREVIATIONS USED

ART, antiretroviral therapy; BLCL, Epstein-Barr virus-transformed B lymphoblastoid cell line; CTLp, cytotoxic T lymphocyte precursor; EDF, estimated date of fertilization; ELISpot, enzyme-linked immunospot assay; HAART, highly active antiretroviral therapy; IPI, inter-pregnancy interval; IQR, interquartile range; LDA, limiting dilution analysis; LMP, last normal menstrual period; MTCT, mother-to-child transmission; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PHA, phytohemagglutinin; rIL-2, recombinant interleukin 2; SFU, spot-forming units.

INTRODUCTION

Pregnancy is associated with quantitative and qualitative modulation of maternal immunity (1, 2). As a general rule, immunoglobulin synthesis is increased in pregnancy (3) whereas cell-mediated immune responses are inhibited (4), as shown by decreased resistance to intracellular pathogens (5) and the remission of T cell-mediated autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis in the majority of pregnant sufferers (6, 7).

Factors associated with an increased risk of mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1 include low maternal CD4⁺ T lymphocyte counts, high viral load, chorioamnionitis, mother-child class I HLA concordance, cervico-vaginal infections, mode of delivery, duration of membrane rupture, and premature delivery (8-12). Current approaches to prevent MTCT rely on elective caesarean section before labour and membrane rupture (13), avoidance of breastfeeding (14), and, most importantly, the use of antiretroviral therapy (ART) during pregnancy, labour and the early neonatal period (9, 15). The long-term efficacy of ART in preventing MTCT may be restricted by: a) the short half-life and toxicity of antiretroviral agents; b) the emergence of drug-resistant HIV-1 variants (16); and c) the limited access to ART in resource-poor settings (17). In addition, cases of HIV-1 transmission to the infant in the presence of ART were reported (18).

CD8⁺ CTL play a pivotal role in controlling disease progression in both SIV and HIV-1 infections (19, 20). Indeed, in acute HIV infection, expansion of antigen-specific T lymphocytes is temporally associated with reduction in plasma viremia (21, 22). Emergence of CTL escape variants and the relationship between patient HLA type, CTL escape, decreased HIV-specific CTL activity, and loss of control of HIV-1 replication are consistent with significant levels of selective pressure exerted on viral populations by CTL responses (23-25).

HIV-specific CTL were detected in uninfected children born to HIV-infected women (26, 27), and selective MTCT of CTL escape mutants was evidenced (28, 29, reviewed in ref. 30). However, comparatively little is known about the specificity and magnitude of CTL responses during pregnancy. In a seminal study that examined HIV-specific CTL responses and MTCT among a large cohort of women, Jin *et al.* reported that the frequencies of anti-Pol and anti-Nef CTL precursors (CTLp) during pregnancy were significantly higher in

non-transmitters than transmitters (31). On the other hand, they observed no association between CD4⁺ T cell counts, HIV-1 plasma viral load, and CTLp frequency in non-transmitters, and no correlation between the breadth of the CTL response and transmission outcome was evidenced (31). In another study, non-transmitting women exhibited significantly higher levels of non-cytolytic CD8⁺ T cell-mediated HIV suppressive activity than transmitters (32). Taken together, these data suggest that: a) there is no severe dysfunction of HIV-specific CTL during pregnancy; and b) maternal CD8-mediated immune responses exert an important influence on the incidence of mother-to-child HIV transmission.

It is well established that HIV-specific CTL frequency declines in HIV-infected adults and children following initiation of ART (33-36). However, there is only limited knowledge regarding the effects of ART on the breadth and magnitude of HIV-specific CTL responses in pregnancy. Likewise, little is known concerning the evolution of HIV-specific cell-mediated immunity during the inter-pregnancy interval (IPI). To investigate these issues, a longitudinal characterization of HIV-specific CTL responses using cytotoxic and enzyme-linked immunospot (ELISpot) assays was performed in 26 HIV-infected women, of whom 9 were followed through consecutive pregnancies.

METHODS

Study population. Twenty-six pregnant HIV-infected women were selected among participants to the Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) mother-child cohort (CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada). Eight of those patients were followed during 2 consecutive pregnancies and 1 during 3 consecutive pregnancies. HIV-1 serologic status was determined using the AxSYM HIV 1/2 gO method (Abbott Diagnostics) and confirmed by western blot. HIV-1 viral load was measured using the Versant HIV-1 RNA 2.0 or 3.0 assays (bDNA, Bayer), with detection thresholds of 2.70 and 1.70 log₁₀ RNA copies/ml plasma, respectively. T cell counts were measured by flow cytometry. HIV genotyping was performed by sequencing a 1,497 nucleotide fragment amplified from the HIV-1 pol gene (positions 2253-3749) (Virco BVBA) or a 524 nucleotide pol fragment (positions 2597-3120) and a 705 nucleotide env fragment (positions 6430-7135) (37). First, second, and third trimesters of pregnancy were defined as 1-12, 13-28, and 29-41 weeks of gestation, respectively. Gestational age, estimated date of fertilization (EDF), and expected date of confinement were calculated based on the self-reported date of the first day of the last normal menstrual period (LMP) when available (n = 31), or from foetal biometry obtained through ultrasound examination performed before 20 weeks of gestation (n = 5). IPI was computed as the time from delivery to the first day of the LMP of the subsequent pregnancy (38). This research protocol was carried out according to the guidelines of the Ethics Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada, where the study was conducted. Informed consent was sought and obtained beforehand from all study participants. Standardized clinical follow-up, including ART, was provided to all women and their children. Treatment within this cohort varied between untreated, two-drug therapy, and highly active antiretroviral therapy (HAART). None of the children born to the study participants acquired HIV infection.

Cell isolation and preparation. Venous blood samples obtained before pregnancy, throughout gestation (1st, 2nd, 3^d trimesters) and postpartum were collected in tubes containing K₂-EDTA as anticoagulant (Becton Dickinson). PBMC were isolated on Ficoll-Hypaque density gradients (Amersham Biosciences) and cryopreserved in FBS (Invitrogen) containing 10% (v/v) DMSO at a concentration of 1-10 x 10⁶ cells/ml. Aliquots were stored in liquid nitrogen and thawed before use.

T lymphocyte culture. For T cell cloning, a microculture technique was used that allows the majority of human T lymphocytes to undergo clonal expansion (39). Briefly, serial dilutions of PBMC (5-400 cells per well) were seeded in round-bottom 96-well plates (Corning) containing 50,000 irradiated (3,000 cGy) allogeneic feeder cells and were cultured for 21 days in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS (Invitrogen), 2 µg/ml phytohemagglutinin (PHA) (Sigma), and 20% (v/v) recombinant IL-2 (rIL-2) (Hoffman-La Roche; obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagents Program). Fresh medium and rIL-2 were replenished biweekly.

Cytotoxicity testing. EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines (BLCL) were generated from each patient to serve as autologous targets in CTL assays. Briefly, 5×10^6 PBMC were infected with 500 µl B95-8 cell line supernatant and were cultured in the presence of cyclosporin A (2 µg/ml) (39). BLCL were infected at a multiplicity of infection of 10 plaque forming units/cell with recombinant vaccinia viruses expressing HIV-1 clade B proteins, including: VVTG 1144 (Gag), VVTG 3167 (Pol), VVTG 1132 (gp120), VVTG 9-1 (Env), VVTG 4113 (Rev), VVTG 3196 (Tat), VVTG 1147 (Nef), and VVTG 186P (Escherichia coli β-galactosidase control) (Transgene SA). Targets were then loaded with ^{51}Cr -Sodium chromate (Amersham Biosciences) and CTL activity was measured in a standard 5 h ^{51}Cr release assay. Specific lysis was computed as $100 \times (E-S)/(T-S)$, where E is the experimental ^{51}Cr release, S is the spontaneous release, and T is the maximum release when targets are lysed with 10% (v/v) Triton X-100. Results were considered positive when % specific lysis was $\geq 10\%$ above control. Minimal estimates of the frequency of CTLp were derived by limiting dilution analysis (LDA) and were computed from the Poisson distribution relationship between the responding cell number and the logarithm of percentage of non-responding (negative) microcultures using the minimal Chi square method (40), as implemented in ELIDA 12c (Ellitron Computing).

Class I MHC typing. DNA was extracted from either PBMC or autologous BLCL using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) and protocols recommended by the manufacturer. HLA typing was performed on 15 study subjects using the line probe assay (Innogenetics).

Synthetic HIV-1 peptide matrices. One hundred and ninety five synthetic peptides (20 amino acids with a 10 amino acid overlap) corresponding to Gag sequences from HIV-1 clades A, B, C, and D (catalogue numbers 3991, 3992, 3993, and 3994, NIH AIDS Research and Reference Reagents Program) were dissolved in 50% (v/v) DMSO at a concentration of 2 mg/ml and were distributed into 56 pools of 6-7 peptides each (final concentration of individual peptide within a pool was 20 µg/ml). Pools were organized into matrices such that each peptide was present in 2 different pools within each matrix.

IFN-γ ELISpot assay. PBMC samples were thawed in the presence of Benzonase Nuclease (Novagen) and were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS and 50 µg/ml gentamicin (Invitrogen). Median viability after thawing was 95% (range: 80%-100%). CD4⁺ cells were immunodepleted using anti-CD4 mAb-coupled immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec). Depletion efficacy was greater than 90%, as confirmed by flow cytometry. Sterile 96-well MultiScreen IP ELISpot plates (Millipore) were coated overnight at 4°C with 100 µl/well of purified mouse anti-human IFN-γ mAb (clone NIB42, BD Biosciences) diluted to 10 µg/ml in PBS (Invitrogen). Plates were blocked for 2 h at 37°C with 200 µl/well of RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS and 50 µg/ml gentamicin. CD4-depleted PBMC were enumerated using a haemocytometer and trypan blue exclusion, and were then diluted ($0.5-1.0 \times 10^6$ cells/ml) in AIM-V medium supplemented with 2% (v/v) human serum (Wisent), 50 µg/ml streptomycin, and 10 µg/ml gentamicin (Invitrogen). One hundred µl of suspension (50,000-100,000 viable cells) was added to each well, combined with 100 µl of peptide pool dilutions (1 µg/ml final concentration). Plates were incubated for 24 h at 37°C under 5 % CO₂ atmosphere, and were then washed 10 times with PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20. Biotinylated mouse anti-human IFN-γ mAb (clone 4S.B3, BD Biosciences) was diluted to 0.5 µg/ml in PBS supplemented with 0.5% (w/v) BSA and was added to the plates (100 µl/well) for 2 h at room temperature. After the plates were washed, streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Bio-Rad), diluted 1:1000 in PBS supplemented with 0.5% (w/v) BSA, was added (100 µl/well) for 1 h at room temperature, followed by washes and a 5 min incubation at room temperature with 100 µl/well of BCIP/NBT (Bio-Rad). The reaction was stopped by washing with tap water and plates were dried, prior to counting on a CTL series 3B Immunospot analyser (Cellular Technology Ltd). IFN-γ production was expressed

as spot-forming units (SFU) and the number of SFU per well was normalized to per 1×10^6 cells and averaged for each sample and antigen. Positive control included: a) 0.005 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 mAb (clone CLB-T3/4.E, Sanquin); and b) 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of a pool of 32 peptides derived from cytomegalovirus (CMV), EBV and influenza restricted by common MHC class I alleles (CEF Peptide Pool, NIH AIDS Research Reagents and Reference Program). Cells were incubated with complete medium only were used as negative control. Assays were considered valid when responses $> 500 \text{ SFU}/10^6$ cells were detected with one of the positive controls. Responses were considered positive when there were $\geq 50 \text{ SFU}/10^6$ cells after background subtraction and when responses were at least 3-fold greater than the autologous negative control wells.

Statistical analysis. Normality of the distribution of sample data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Student's t tests (normally-distributed data), Mann-Whitney U tests (non-Gaussian distribution), and Kruskal-Wallis tests with Dunn's post tests (multiple comparisons) were used to assess differences between groups. Spearman's correlation was used to test the strength of association between variables and to process rank data. Categorical variables were examined using Fisher's exact test. Pairwise comparisons between hierarchical data were performed by computing the sum of squared differences between ranks (Σd^2), with $\Sigma d^2 = 0$ when hierarchies are identical. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software).

RESULTS

Clinical characteristics of study subjects. The study group was comprised of 26 pregnant, HIV-infected women. Eight subjects were followed during 2 consecutive pregnancies and one during 3 consecutive pregnancies, for a total of 36 individual pregnancies examined. Biological samples were obtained and clinical parameters were measured with at least 3 separate time points in 33 of 36 pregnancies and at 2 time points in the 3 remaining cases (TV437a, TV501a, and TV1081), for a total of 133 time points analyzed. Median age at EDF was 31.9 years (range = 17.1-44.3 years). Measured at the time point closest to the EDF, median CD4⁺ T cell count was 525 cells/mm³ (interquartile range [IQR] = 315-600 cells/mm³), median CD8⁺ T cell count was 672 cells/mm³ (IQR = 517-882 cells/mm³), and median HIV-1 viral load was 3.64 log₁₀ RNA copies/ml plasma (IQR = 2.79-3.94 log₁₀ RNA copies/ml plasma). In 25 of 36 pregnancies, subjects reached undetectable viral load at the time of delivery. Twelve of 26 subjects (46.1%) were infected with clade B HIV-1, while 14 were infected with non-clade B variants, including subtypes A (n = 4), C (n = 3), D (n = 1), CRF02_AG (n = 5) and one unclassified recombinant (TV555; Table 1) (37). ART was used for maternal health and to prevent MTCT in 34 of 36 pregnancies studied (94.4%). Two subjects (TV463 and TV507) refused treatment. However, TV463 attained undetectable viral load in absence of treatment. In 3 of 34 treated pregnancies (8.8%), ART consisted of double combination therapy with nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), while combination of three or more antiretroviral agents regimens were used in 31 of 34 cases (91.2%) (Table 1).

Overall, there was a strong positive correlation between CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts measured at corresponding time points ($r^2 = 0.219$; $p < 0.0001$), a negative correlation between circulating HIV-1 viral load and CD4⁺ T cell counts ($r^2 = 0.124$, $p < 0.0001$), but no correlation between circulating HIV-1 viral load and CD8⁺ T cell counts ($r^2 = 0.0003$, $p = 0.833$) (data not shown). Not surprisingly, median viral load measured at time points when patients were not under antiretroviral treatment (3.71 log₁₀ RNA copies/ml plasma) was significantly higher than that measured at times when patients were treated with ART (1.70 log₁₀ RNA copies/ml plasma; $p < 0.0001$, Mann-Whitney *U* test) (data not shown). Statistically significant negative correlations were observed between HIV-1 viral load and gestational age measured at corresponding time points ($r^2 = 0.0538$; $p = 0.0029$) (Figure 1A) and between CD8⁺ T cell counts and gestational age ($r^2 = 0.0412$, $p = 0.0124$) (Figure

1B). However, no such correlation was observed between CD4⁺ T cell counts and gestational age ($r^2 = 0.0096$, $p = 0.2143$) (Figure 1C).

Cytolytic activity of HIV-specific CTL. To characterize CTL responses, CD8⁺ T cell microcultures were derived from PBMC samples obtained at each time point by in vitro expansion on irradiated allogeneic feeder cells in presence of PHA and IL-2. Cytotoxic activity of expanded microcultures was then tested against target cells expressing either one of 7 clade B HIV-1 proteins (Gag, Pol, gp120, Env, Rev, Tat, and Nef) using standard ⁵¹Cr release assays, and CTLp frequencies were computed by LDA. HIV-specific CTLp (any target) were detected in all study subjects, with the exception of TV437 and TV479, in whom no proliferation of T cell microcultures was observed in both first and second pregnancies, even at high input cell number (400 cells per well; data not shown). HIV-specific CTLp frequencies observed in study subjects ranged between 0 (TV853, 2nd pregnancy) and 1.569×10^{-2} (1:64, TV733). Overall, CTLp frequency was negatively correlated with CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts, and these correlations were statistically significant ($r^2 = 0.134$, $p = 0.0154$; and $r^2 = 0.0822$, $p = 0.0475$, respectively) (Figure 2A and 2B). CTLp frequency was also positively correlated with HIV-1 viral load in study participants irrespective of treatment, but this observable trend did not reach statistical significance ($r^2 = 0.0590$; $p = 0.0654$) (Figure 2C). CTLp frequencies were compared in samples from the first ($n = 7$), second ($n = 12$), and third trimesters ($n = 16$) and were found to be stable throughout pregnancy ($p = 0.718$, Kruskal-Wallis test) (data not shown). Likewise, median CTLp frequencies were not significantly different between the first and subsequent pregnancies ($p = 0.980$, Mann-Whitney *U* test), and were similar in subjects infected with clade B ($n = 6$) and non-clade B ($n = 5$) HIV-1 variants ($p = 0.251$, Mann-Whitney *U* test) (data not shown). Finally, to characterize the impact of ART on HIV-specific CTL responses, subjects and time points were stratified as treated ($n = 26$) or untreated ($n = 15$) (Table 1). Median HIV-specific CTLp frequency was higher in absence of treatment (1.747×10^{-3} , IQR = 1.469×10^{-3} - 6.263×10^{-3}) than in the presence of ART (1.332×10^{-3} , IQR = 7.869×10^{-4} - 2.582×10^{-3}), a statistically significant difference ($p = 0.0435$, Mann-Whitney *U* test) (Figure 2D).

Specificity and hierarchy of antigenic recognition. To provide a global assessment of antigenic specificity and hierarchy of HIV-1 antigen recognition by CTL, microculture

cytotoxicity data obtained in first, second, and third trimester samples were pooled for each individual pregnancy. CTL responses directed against all 7 antigens tested were detected in the majority of pregnancies (13 of 15; 86.6%) where T cell microculture proliferation was observed (*i.e.* all except TV437 and TV479). Gag was the antigen most frequently recognized by CTL, accounting for a median 21.01% of HIV-specific microcultures derived from study subjects on a per patient basis (IQR = 17.43%-27.65%). In terms of CTL recognition, Gag was closely followed by Pol (median = 16.42%, IQR = 10.08%-24.65%), gp120 (median = 13.85%, IQR = 10.56%-16.20%), Env (median = 12.31%, IQR = 9.75%-17.23%), Tat (median = 11.96%, IQR = 8.37%-14.55%), Nef (median = 11.76%, IQR = 7.04%-16.36%), and Rev (median = 7.46%, IQR = 5.54%-10.88%). Statistical analysis of this hierarchy revealed that there were significant differences in the median frequencies of recognition of the 7 CTL targets within our study group ($p = 0.0136$, Kruskal-Wallis test), and that these disparities were largely accounted for by the difference in levels of recognition of Gag and Rev ($p < 0.01$, Dunn's multiple comparison test) (Figure 3A). Very similar results were obtained when data were analyzed on a per pregnancy basis instead of on a per patient basis (Figure 3B). Interestingly, median HIV-1 viral load was higher in pregnancies where Gag was the HIV-1 antigen most frequently recognized by T cell microcultures (3.21 \log_{10} RNA copies/ml plasma, IQR = 2.74-3.67 \log_{10} RNA copies/ml plasma), as compared with pregnancies in which another gene product topped the hierarchy (1.97 \log_{10} RNA copies/ml plasma, IQR = 1.70-3.68 \log_{10} RNA copies/ml plasma; $p = 0.0508$, Mann-Whitney U test). In addition, the proportion of time points with HIV-1 viral load below 2.70 \log_{10} RNA copies/ml plasma was significantly lower in pregnancies where Gag was the most frequently recognized antigen (4 pregnancies, 3 of 12 time points), as compared with pregnancies in which another HIV-1 antigen was preferentially targeted (11 pregnancies, 22 of 32 time points; $p = 0.0115$, Fisher's exact test).

Hierarchy of CTL target recognition was then examined using rank statistics. In subjects with multiple pregnancies, the hierarchy of HIV-1 antigen recognition was not significantly correlated between consecutive pregnancies ($r^2 = 8.262 \times 10^{-5}$ -0.0882; $p > 0.498$) (Figure 3C). Variation in hierarchy was tested by computing the sum of squared differences between ranks for each CTL target (Σd^2) and using this score to compare individual pregnancies in a pairwise manner. This analysis revealed that differences in hierarchy of

antigen recognition were comparatively larger between consecutive pregnancies (median $\Sigma d^2 = 57.00$) than when subjects with one pregnancy were compared with one another in a pairwise fashion (median $\Sigma d^2 = 38.50$; $p = 0.0219$, Student's t test) (Figure 4A). This suggests the existence of robust selective forces shaping the profile of HIV-1 antigen recognition by CTL between consecutive pregnancies. In addition, the magnitude of differences in hierarchy was positively correlated with duration of the IPI in subjects with multiple pregnancies ($r^2 = 0.601$; $p = 0.0240$), indicating that longer intervals were associated with significantly larger differences in CTL antigenic recognition profiles (Figure 4B).

Production of IFN- γ by Gag-specific CTL. Gag was the antigen most frequently recognized by HIV-specific CTL in the present study and others (41, 42). Based on these facts, Gag-specific responses were further examined before, during and after pregnancy in 15 pregnant HIV-infected women from our study group for whom sufficiently large PBMC samples were available, including 3 subjects who were followed during 2 consecutive pregnancies. The magnitude and the breadth of antigen recognition by Gag-specific CTL were characterized using IFN- γ ELISpot and panels of overlapping Gag peptides corresponding to the subtype of the HIV-1 isolate infecting each particular study subject (clade A, B, C, or D). For subjects TV1257 and TV1407, the clade A peptide panel was used because the Gag region of the CRF02_AG corresponds to that of clade A (43). Magnitude of the CTL response was defined as the sum of responses (SFU) to all peptide pools in the matrix, divided by 2 (*i.e.* each peptide is represented twice within the matrix). Overall, magnitude of peptide-specific CTL responses ranged between 0 SFU/ 10^6 cells (subjects TV1093, *postpartum*; TV1123, days 117 and 263; TV1175, *postpartum*; and TV1369, day 208 and *postpartum*) and 9132 SFU/ 10^6 cells (subject TV1087, day 150) (Figure 5; Supplemental Figure 1). Longitudinal changes in the magnitude of CTL responses were observed in all pregnancies examined, irrespective of treatment or whether HIV-1 viral load was stable and/or below the limit of detection. Breadth of antigen recognition was defined as the number of peptide pools that were recognized in a given study subject at a given time point. Presumptive antigenic peptides were identified by matrix deconvolution and, in 3 cases (*e.g.* TV1241, TV1257, and TV1407), this was further ascertained by testing of individual peptides (Figure 5). Breadth ranged between 0 peptide

pools (subjects TV1093, *postpartum*; TV1123, days 117 and 263; TV1175, *postpartum*; and TV1369, day 208 and *postpartum*) and 13 peptide pools (subject TV1087, day 262). Again, important longitudinal changes in the breadth of CTL responses were observed in the majority pregnancies examined, irrespective of treatment or HIV-1 viral load (Figure 5; Supplemental Figure 1). Finally, minimal epitope candidates were identified by cross-referencing of the subject's HLA type with HIV-1 epitope databases (44) and results of peptide prediction algorithms (45, 46) (Table 2).

Study subjects were then stratified into 2 groups: a) subjects with undetectable HIV-1 viral load ($< 1.70 \log_{10}$ RNA copies/ml) before and throughout pregnancy; and b) subjects with detectable viral load ($> 1.70 \log_{10}$ RNA copies/ml) at some point during the study period. Overall, subjects with detectable viral load had higher numbers of SFU/ 10^6 cells than subjects with undetectable viral load, and this difference was statistically significant ($p < 0.0001$, Mann-Whitney U test) (Figure 6A). Likewise, subjects with detectable viral load recognized larger numbers of peptide pools than those in whom viral load was undetectable ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test) (Figure 6B).

Next, the effect of initiation of pregnancy on CTL responses was examined by comparing magnitude and breadth of antigenic recognition at the last available time point before initiation of pregnancy and at the first available time point after initiation of pregnancy. On the whole, there was no significant difference between the numbers of SFU/ 10^6 cells measured pre-pregnancy and during pregnancy ($n = 11$; $p = 0.8438$, Mann-Whitney U test). In fact, the magnitude of HIV-specific CTL responses remained remarkably stable (Figure 7A), a stability that was translated into a strong correlation between the magnitude of CTL responses before and after initiation of pregnancy ($r^2 = 0.9654$; $p < 0.0001$) (Figure 7B). Similarly, although fluctuations in the breadth of antigen recognition were observed in some cases following initiation of pregnancy, these differences were not statistically significant ($n = 11$; $p = 0.7149$, Mann-Whitney U test) (Figure 7C), and the breadth of antigen recognition by CTL recognition was correlated before and after initiation of pregnancy ($r^2 = 0.5530$; $p = 0.0087$) (Figure 7D). Finally, comparisons drawn over the entire study period (*e.g.* pre-pregnancy, 1st, 2nd, 3d trimesters, and *postpartum*) revealed no statistically significant differences in terms of magnitude and breadth of CTL recognition ($n = 15$; $p = 0.7328$ and $p = 0.8494$, respectively, Kruskal-Wallis test) (Figures 8A and 8B).

DISCUSSION

This study was initiated to shed light on several aspects of HIV-specific cell-mediated immunity in pregnancy, namely: a) the effects the introduction of ART has on the magnitude of HIV-specific CTL responses; b) the antigenic specificity and hierarchy of HIV-specific CTL in pregnancy; and c) the evolution of HIV-specific cell-mediated immunity during the IPI.

First, our results showed that there was a negative correlation between HIV-1 viral load and gestational age. This can be explained by the fact that ART was intensified during pregnancy if undetectable viral load was not attained. In addition, HIV-specific CTLp frequency was significantly higher at time points where no treatment was administered (*i.e.* in absence or prior to initiation of treatment). These findings are in line with previous reports that showed a decline in CTL responses following initiation of ART in HIV-infected adults and is thought to reflect the need for continuous exposure to cognate antigen to maintain elevated levels of CTL in the circulation (33, 34, 47, 48). All targets confounded, HIV-specific CTLp frequency was negatively correlated with CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts in study subjects. As CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts are strongly correlated with one another in our study group (data not shown), this indicates that the magnitude of HIV-specific CTL responses increases as HIV disease progresses. The association between treatment and lower CTLp frequencies also indicates that the negative correlation observed between CTLp and CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts did not result from a bias caused by subjects with low CD4 being treated with more potent ART regimens. In addition, HIV-specific CTLp frequency was not significantly correlated with HIV-1 viral load, though a positive trend was observed. These results are consistent with previous reports that show little or no association between T cell-mediated immune responses, CD4⁺ T cell counts and viral load in presence of treatment (41, 49).

In two cases, TV437 and TV479, HIV-specific CTLp were not detected during their pregnancies. This is surely due to undetectable viral loads (< 2.70 log₁₀ RNA copies /ml plasma) in subject TV437 and to extremely low CD8⁺ T cell counts (180 and 234 cells/mm³) in subject TV479 (Table I).

Overall, median CTLp frequency was not significantly different in subjects infected with clade B versus non-clade B HIV-1 variants (data not shown). As the targets used in ^{51}Cr release assays only expressed clade B gene products, this suggests that a significant proportion of CTL responses observed in non-B patients result from cross-clade recognition of HIV-1 antigens (50-52). Finally, no significant cross-sectional variations in median HIV-specific CTLp frequencies were observed between 1st, 2nd, and 3^d third trimesters, or between consecutive pregnancies in our study group. However, as CTLp frequencies reported herein represent global responses to all HIV antigens tested and not responses to individual antigens or epitopes, these results cannot be interpreted as evidence of a complete lack of qualitative differences in CTL activity between samples obtained at various time points.

CTL responses were then examined based on the identity of HIV antigens recognized in individual study subjects. This analysis revealed all 7 HIV antigens tested were recognized in every pregnancy, with the exception of TV481b (5 antigens) and TV853a (6 antigens) (Figure 3C). Consequently, our data does not support the existence of significant cross-sectional (inter-patient) and longitudinal (intra-patient) differences in terms of breadth of HIV-1 antigen recognition by CTL, at least at the level of whole HIV proteins. Gag was the antigen most frequently recognized (*i.e.* immunodominant) by T cell microcultures derived from study subjects, followed by Pol and Env, while Tat, Rev, and Nef were recognized least frequently. These results are in agreement with Lichterfeld *et al.*, who reported that Nef-specific CTLs dominated the total response in subjects with primary HIV-1 infection, while Gag-, Env- and Pol-specific CTLs topped the hierarchy following transition to chronic HIV-1 infection (53). However, an association between Gag-dominant CTL responses and higher viral load was evidenced in our study group, in contrast to the preferential targeting of Gag by CTL that was associated with control of viral replication in primary and chronic HIV-1 infection (54, 55). These differences might stem from pregnancy-related factors or from differences in sample size, treatment modalities, and study populations.

Next, using rank statistics, we showed that changes in the hierarchy of HIV-1 antigen recognition were greater and more narrowly distributed between consecutive pregnancies (intra-host) than what was observed in pairwise comparisons of hierarchies from different

study subjects (inter-host). Even though a limited number of subjects were examined, this finding suggests the presence of intra-host selective forces that drive evolution of hierarchical antigenic recognition between pregnancies and results in detectable changes in immunodominance. Furthermore, the extent of variation in the hierarchy of antigenic recognition observed between consecutive pregnancies was correlated with the duration of the IPI. This suggests that intra-patient hierarchical diversification of CTL responses comprises a time-dependent component and could possibly parallel the evolution of HIV-1 sequences and continual CTL escape. According to published results, this is the first time that such time-dependent evolution of the hierarchy of antigen recognition by CTL is described in the context of HIV-1 infection. Possible explanations for this phenomenon could include sequential waves of expansion and contraction of CTL clones of varied antigenic specificity (56) and/or cyclic escape from CTL responses (57), something which we could not document in the present study. Finally, as all participants were pregnant, we cannot exclude that hierarchical diversification was related to some aspects of pregnancy-associated modulation of cell-mediated immune responses (58).

One important limitation of the present study was that CTL activity was measured in large part using ^{51}Cr release assay following *in vitro* T cell expansion, and CTLp frequencies were computed by LDA. This should be considered a minimal estimate since limiting dilution analysis almost certainly underestimates the true frequency of CTL effectors (59). To circumvent this limitation, IFN- γ ELISpot and overlapping HIV-1 Gag peptide panels were used to estimate peptide-specific responses and, where possible, perform epitope mapping. Statistically significant differences in terms of magnitude and breadth of CTL recognition were observed between subjects with detectable viral load and those whose viral load was undetectable (Figure 6). Indeed, subjects with detectable viral load had higher numbers of SFU/ 10^6 cells and recognized larger numbers of peptide pools than those whose viral load was undetectable. This confirms results obtained with ^{51}Cr -release assays and LDA (see above) and is consistent with the fact that suppressive antiretroviral treatment is generally associated with a reduction in the number of circulating HIV-specific CTL effectors (33, 34, 47, 48). Most interestingly, our results showed that initiation of pregnancy *per se* is not associated with statistically significant changes in either magnitude of the Gag-specific CTL response or the breadth of Gag-peptide recognition. In fact, magnitude and breadth do not vary significantly between the pre-pregnancy period, 1st, 2nd,

and 3^d trimesters, and the postpartum period, at least as far as Gag-specific CTL responses are concerned. These results reveal for the first time that initiation, progression, and termination of pregnancy by themselves do not change the magnitude and breadth of CTL responses in terms of IFN- γ production.

Taken together, data presented herein expand on results obtained in previous studies and confirm that pregnant HIV-infected women generate robust HIV-specific CTL responses that are inconsistent with a broad dysfunction of cell-mediated immunity during pregnancy (31, 32). The use of ART was also associated with a decline in the magnitude of HIV-specific CTL responses during pregnancy, something that was shown to occur in adults and children alike (48, 56). As well, cross-clade CTL responses can be detected in pregnant women infected with HIV-1. Finally, evolution of CTL responses during the IPI is characterized by changes in the hierarchy of antigenic recognition by CTL, but not by variations in the breadth and/or magnitude of that response. These results add to the body of evidence supporting the development of immunization strategies to prevent MTCT of HIV-1 (60, 61). A better understanding of the dynamics of HIV-specific CTL responses during pregnancy in particular, and of maternal cell-mediated immunity in general, will lead to improved design of vaccines to prevent MTCT of HIV-1.

TABLES AND FIGURES**Table I. Clinical and demographic characteristics of HIV-infected study participants.**

Subjects	Age (yrs) ¹	CD4 ⁺ T cell count (cells/ml) ²	CD8 ⁺ T cell count (cells/ml) ²	Viral load (log ₁₀ RNA copies/ml plasma) ²	Clades and CRF	Country of origin	Antiretroviral treatment			Assay Conducted
							1 st trimester ³	2 nd trimester	3 rd trimester	
TV437a ⁴	43.1	559	481	<2.70	B	HAI	none	AZI/3TC	AZI/3TC	CTL
TV437b	44.3	570	540	<2.70			AZI/3TC/SQV	AZI/3TC/SQV	AZI/3TC/SQV	CTL
TV457	33.1	184	496	3.08	C	COD	AZI/3TC/IDV	AZI/3TC/IDV	AZI/3TC/IDV	CTL
TV463	36.3	946	858	<2.70	B	CAN	none	none	none	CTL
TV479a	27.5	192	234	4.51	B	CAN	none	AZI/3TC	AZI/3TC	CTL
TV479b	29.8	110	180	4.71			none	D4T/3TC	D4T/3TC	CTL
TV481a	31.9	980	1176	4.19	B	HAI	none	none	AZI/3TC/D4T	CTL
TV481b	37.5	572	1210	4.97			AZI/3TC	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	CTL
TV501a	30.3	342	387	3.70	B	CAN	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	CTL
TV501b	33.1	598	494	1.92			AZI/3TC/ABC	AZI/3TC/ABC	AZI/3TC/ABC	CTL
TV501c	35.7	312	368	<1.70			AZI/3TC/ABC	AZI/3TC/ABC	AZI/3TC/ABC	CTL
TV507	27.8	589	627	3.34	A	CGO	none	none	none	CTL
TV555a	30.8	168	266	4.33	AJ ⁵	COD	none	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	CTL
TV555b	32.4	253	517	2.07			AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NVP	CTL
TV565a	30.7	510	810	2.23	B	CAN	AZI/3TC	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	CTL
TV565b	32.8	600	660	1.95			AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NVP	CTL
TV733	27.5	594	882	3.42	A	COD	none	none	AZI/3TC/NFV	CTL
TV833a	25.0	475	988	<1.70	C	ZWE	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	CTL
TV833b	26.8	840	860	<1.70			AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	CTL
TV961	35.8	684	836	<1.70	B	CAN	LPV/r/ABC	LPV/r/ABC	LPV/r/ABC	ELISpot
TV1081	28.7	704	1078	<1.70	D	CGO	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	ELISpot
TV1087a ⁶	31.1	703	836	4.13	B	CAN	none	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	ELISpot
TV1087b	32.1	756	1050	3.87			AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	ELISpot
TV1093	27.3	480	752	3.41	CRF02_AG	GUI	none	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	ELISpot
TV1123	31.8	nd	nd	<1.70	CRF02_AG	GUI	D4T/3TC/NFV	D4T/3TC/NFV	D4T/3TC/NFV	ELISpot
TV1175	23.1	704	640	<1.70	B	CAN	AZI/3TC/NVP	AZI/3TC/NVP	AZI/3TC/NVP	ELISpot
TV1197	30.7	540	1080	2.84	B	CAN	AZI/3TC/RV/TDF/ABC	AZI/3TC/RV/TDF/ABC	AZI/3TC/RV/TDF/ABC	ELISpot
TV1241a	35.2	325	741	2.64	A1	RWA	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	ELISpot
TV1241b	36.2	510	901	<1.70			AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	ELISpot
TV1257	35.0	nd	nd	nd	CRF02_AG	CAN	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	ELISpot
TV1269	34.3	576	672	<1.70	CRF02_AG	GUI	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	ELISpot
TV1289 ⁶	17.1	264	672	2.51	B	CAN	EFV/3TC/TDF	AZI/3TC/LPV/r	AZI/3TC/LPV/r	ELISpot
TV1347 ⁶	18.0	462	1113	4.14	C	CGO	none	ABC/3TC/NFV	ABC/3TC/NFV	ELISpot
TV1363	35.3	490	546	<1.70	A	COD	TDF/FTC/3TC/ATZ	TDF/FTC/3TC/ATZ	TDF/FTC/3TC/ATZ	ELISpot
TV1369 ⁶	35.5	144	549	3.88	B	HAI	AZI/3TC	AZI/3TC/NFV	AZI/3TC/NFV	ELISpot
TV1407	24.2	297	nd	<1.70	CRF02_AG	GUI	AZI/3TC/ABC/LPV/r	AZI/3TC/ABC/LPV/r	AZI/3TC/ABC/LPV/r	ELISpot

¹Calculated with the estimated date of fertilization (EDF), as described under Methods. ²CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts, viral load (measured at the time point closest to the EDF), and HIV-1 clade were determined as described under Methods. ³First, 2nd, and 3^d trimesters were defined as 1-12, 13-28, and 29-41 weeks of gestation, respectively. ⁴Lowercase letter in patient identifier denotes first (a), second (b), or third (c) consecutive pregnancy, respectively. ⁵Unclassified recombinant containing regions of significant homology to clades A and J (see reference n°37). ⁶Pregnancies for which certain time points were combined when confronted with limited cell sample availability. CRF: Circulating recombinant forms; HAI: Haiti; COD: Democratic Republic of the Congo; CGO: Congo; CAN: Canada; ZWE: Zimbabwe; GUI: Guinea; RWA: Rwanda; AZT: zidovudine; 3TC: lamivudine; SQV: saquinavir; IDV: indinavir; D4T: stavudine; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapine; ABC: abacavir; LPV/r: lopinavir and ritonavir; EFV: efavirenz; TDF: tenofovir disoproxil fumarate; FTC: emtricitabine; ATZ: atazanavir.

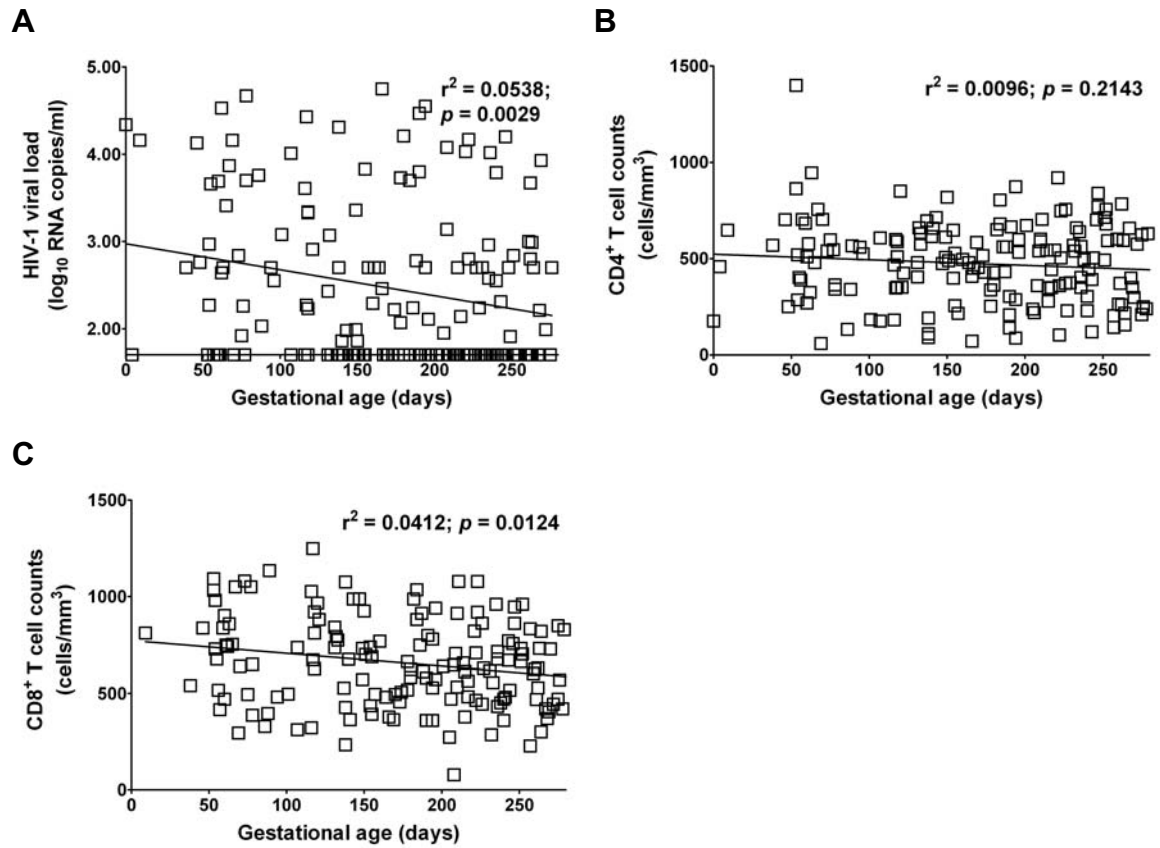


Figure 1. Clinical parameters in study participants.

Absolute CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts, gestational age, and HIV-1 viral load were determined as described under Methods. A. Correlation between HIV-1 viral load and gestational age. B. Correlation between CD8⁺ T cell counts and gestational age. C. Correlation between CD4⁺ T cell counts and gestational age.

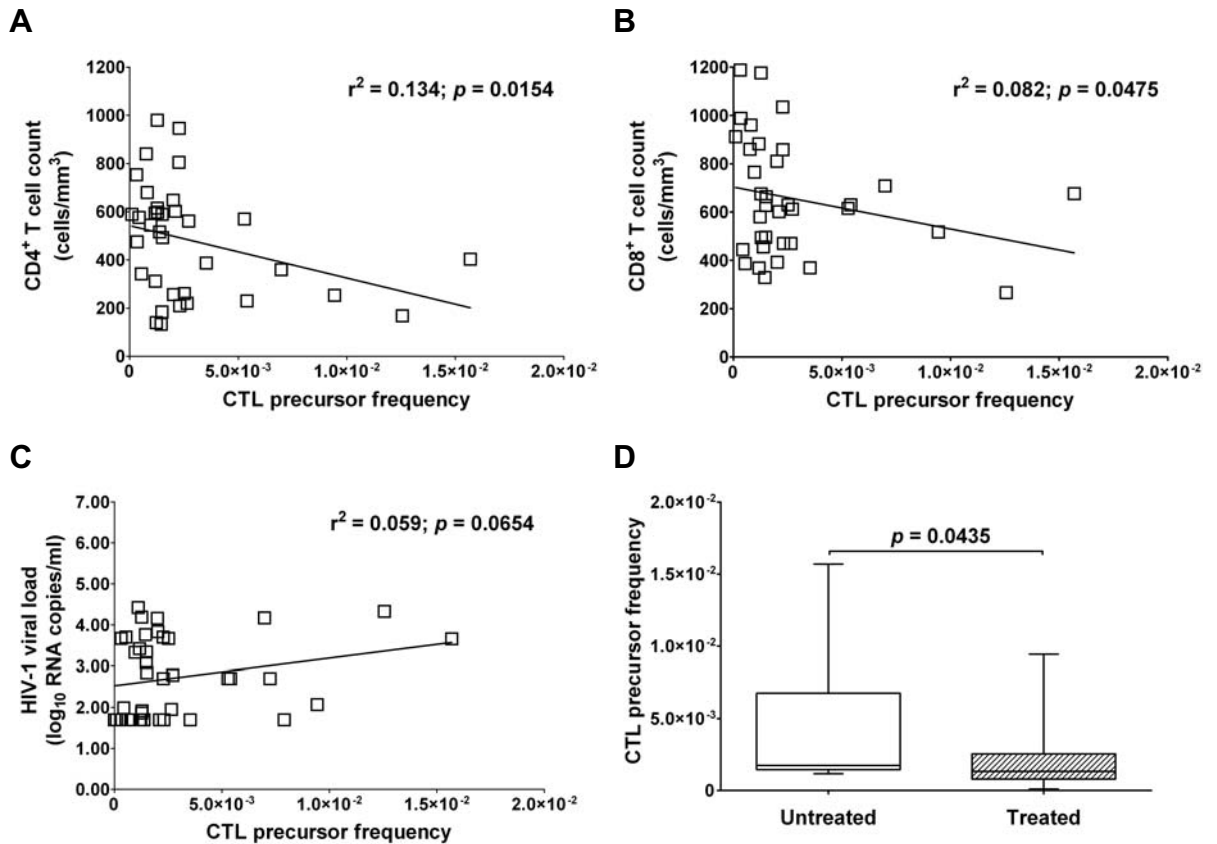


Figure 2. HIV-specific CTL precursor frequencies in study participants.

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

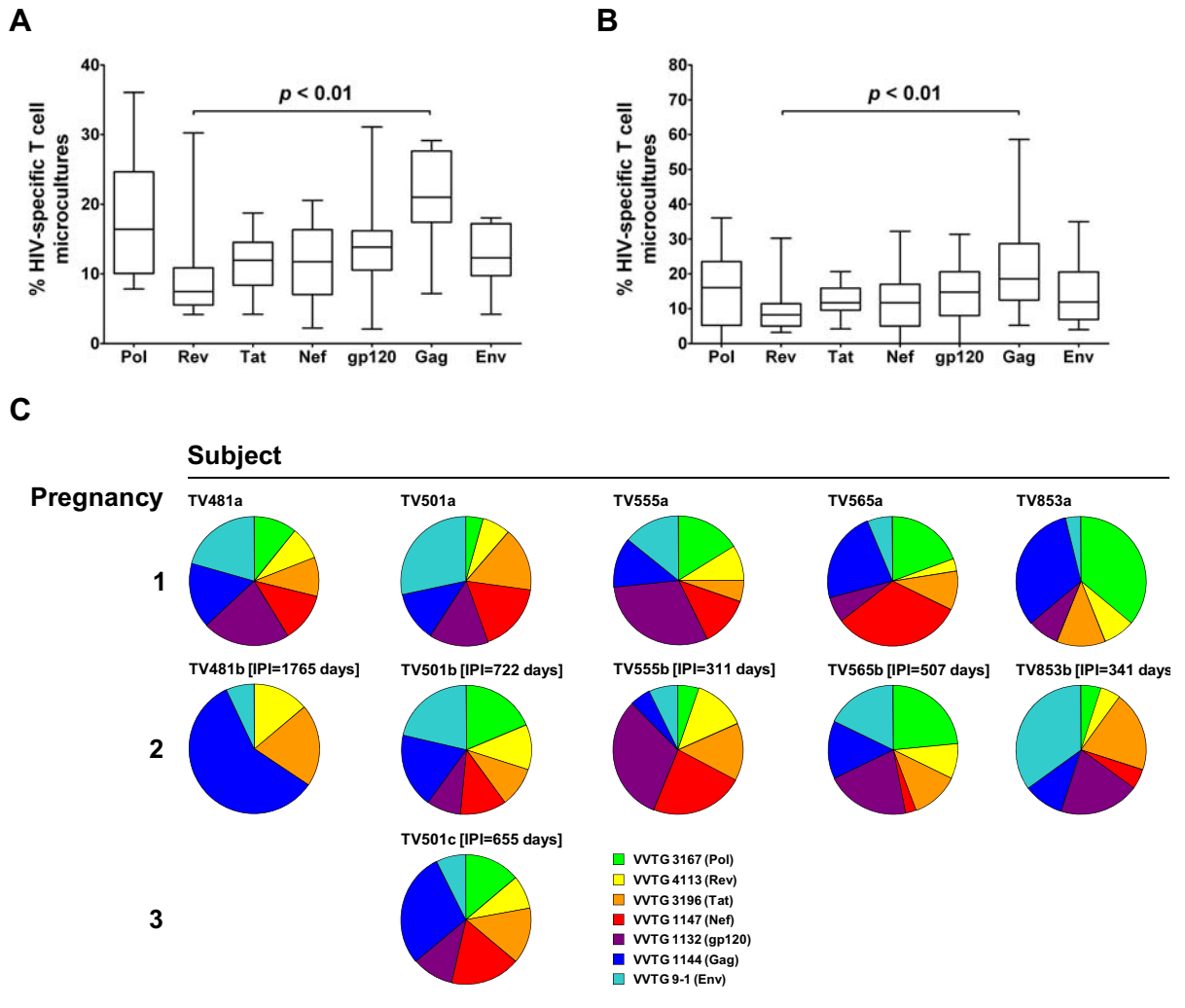


Figure 3. HIV antigenic specificity of T cell microcultures derived from study participants.

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

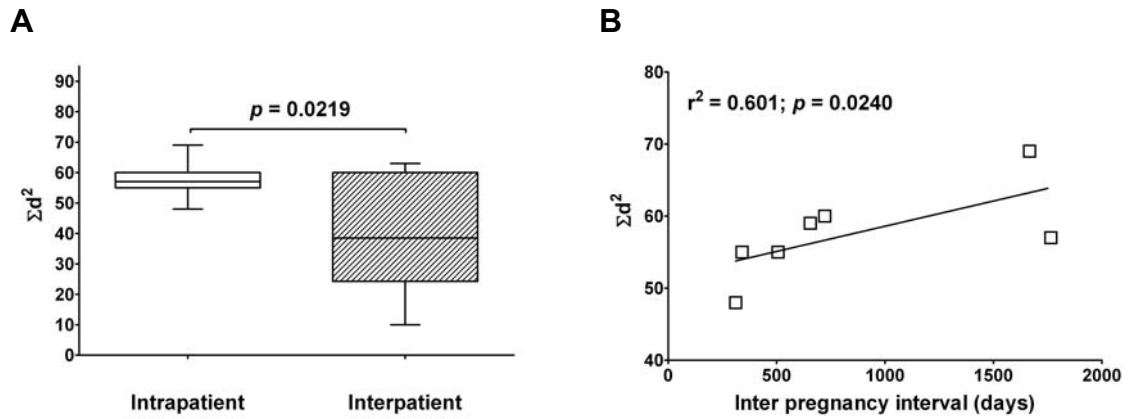


Figure 4. Hierarchy of HIV-1 antigen recognition by T cell microcultures derived from study participants.

HIV-specific T cell microcultures were derived and the sum of squared differences between ranks (Σd^2) was computed as described under Methods. A. Pairwise comparisons of HIV-1 antigen hierarchy between consecutive pregnancies (intra-patient) or between subjects with one pregnancy (inter-patient). B. Correlation between Σd^2 and the inter-pregnancy interval (IPI) in subjects with consecutive pregnancies.

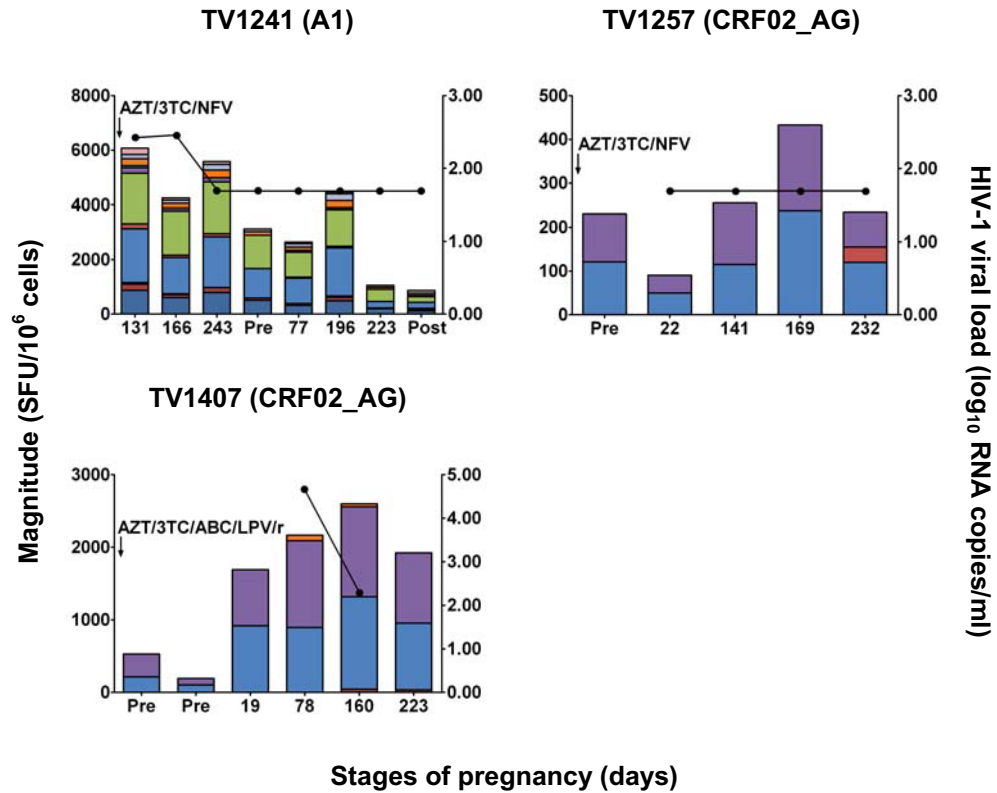


Figure 5. Evolution of HIV-1 peptide-specific CTL responses before, during, and after pregnancy.

IFN- γ production by HIV Gag-specific CTL, gestational age, and HIV-1 viral load were determined as described under Methods. The left y-axis represents numbers of SFU/10⁶ cells. The height of the bar reflects the total magnitude of the response to the whole peptide matrix at each time point. Each stacked bar (represented by a different color) represents the response to individual peptide pools. The right y-axis represents HIV-1 viral load. Arrows indicate the time of introduction of antiretroviral treatment.

Table II. Individual HIV-specific CTL peptides recognized by three study participants.

Study subjects	MHC class I type	Location	Gestation (days)	Amino acid sequence	HLA restriction	Location of epitope	Amino acid sequence of the epitope ²	
TV1241	A2, A74, B27, B49, Cw2, Cw7	p17, 11-30	166	223	B27	p17, 18-26	KIIRLPGGK	
				GKLDAWEKIIRLPGGKKKYR		B27	p17, 18-27	KIIRLPGGKK
						B27	p17, 19-27	IRLRPGGKK
		p17, 71-90				A2	p17, 74-83	ELRSLYNTVA
				GTEELRSLYNTVATLYCVHQ		A2	p17, 77-85	SLYNTVATL
						A2	p17, 77-86	SLYNTVATLY
		p17-p24, 131-18				A2	p17, 80-88	NTVATLYCV
						A2	p24, 18-26	RTLNAWVKV
						A2	p24, 19-27	TLNAWVKVI
		p24, 69-88				A2	p24, 78-86	AEWDRVHPV
						A2		
						A2		
		p24, 89-108				A2		
						A2		
						A2		
p24, 149-168				A2				
				A2				
				A2				
p24, 209-228				A2				
				A2				
				A2				
p24-p27/p1p6, 218-7				A2				
				A2				
				A2				
p2p7/p1p6, 18-37				A2				
				A2				
				A2				
p2p7/p1p6, 58-77				A2				
				A2				
				A2				
TV1257	A2, A25, B15, B44, Cw5, Cw7	p24, 69-88	Pre	22	A2	p24, 78-86	AEWDRVHPV	
				LKDTINEEAAEWDRLHPVHA		A25	p24, 71-80	ETINEEAAEW
p24, 189-208								
TV1407	A33, B35, B58, Cw3, Cw4	p17, 11-30	78	223	Cw4	p17, 22-31	RPGGKKKYKL	
				GKLDAWEKIIRLPGGKKKYR		Cw4	p17, 21-40	LRPGGKKYRKLHLVWASRE
				LRPGGKKYRKLHLVWASRE		B58	p17, 22-31	RPGGKKKYML
p17, 21-40								
p17, 51-70								
p17, 61-80								
p17, 91-110								
p24, 19-38								
p24, 29-48								
p24, 39-58								
p24, 69-88								
p24, 89-108								
p24, 159-178								
p24, 169-188								
p2p7/p1p6, 18-37								
p2p7/p1p6, 28-47								

¹HLA class I typing was performed as described under Methods. ²Amino acid sequence of CTL epitope were obtained by cross-referencing of the subject's class I HLA type with HIV-1 epitope databases and results of peptide prediction algorithms (44-46).

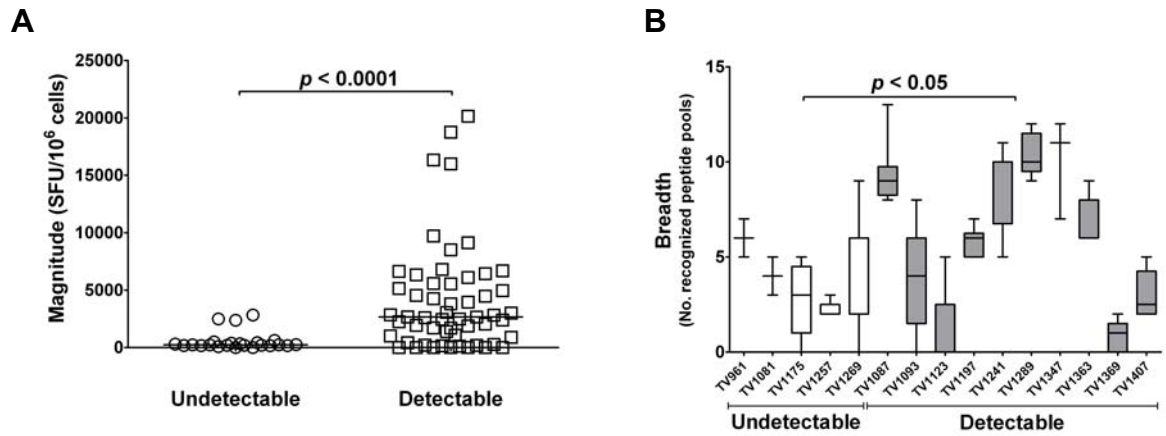


Figure 6. Magnitude and breadth of HIV-specific CTL responses and control of viral load during pregnancy.

Magnitude (*i.e.* the sum of responses (SFU) to all peptide pools in the matrix, divided by 2) and breadth (*i.e.* the number of peptide pools that were recognized in a given study subject) of HIV-specific CTL responses were estimated using ELISpot as described under Methods. Study subjects were stratified as having an undetectable HIV-1 viral load ($< 1.70 \log_{10}$ RNA copies/ml) before and throughout pregnancy ($n = 5$), or as having a detectable HIV-1 viral load ($> 1.70 \log_{10}$ RNA copies/ml) at some point during the study period ($n = 10$).

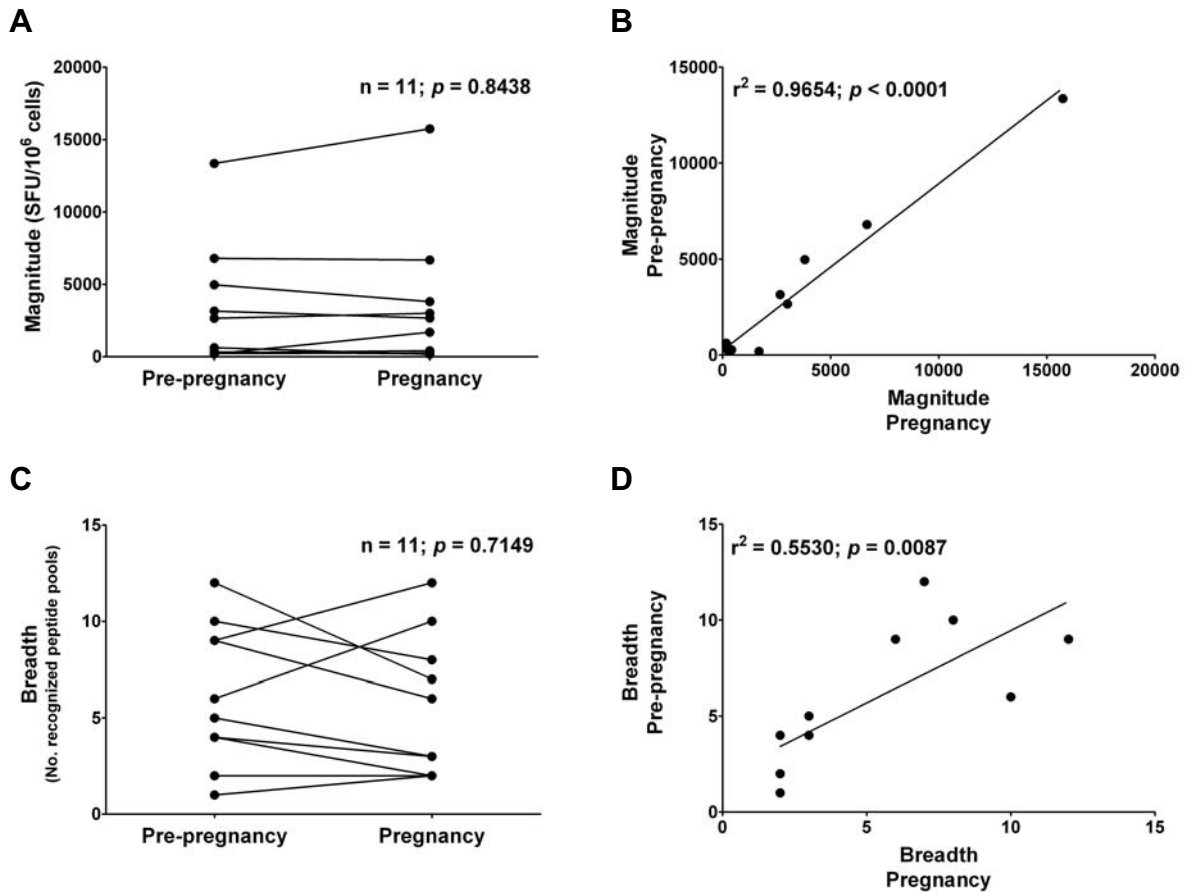


Figure 7. Magnitude and breadth of HIV-specific CTL responses around the time of initiation of pregnancy.

Estimated date of fertilization (EDF), and the magnitude (*i.e.* the sum of responses (SFU) to all peptide pools in the matrix, divided by 2) and breadth (*i.e.* the number of peptide pools that were recognized in a given study subject) of HIV-specific CTL responses were estimated as described under Methods. Shown are the numbers of SFU/10⁶ cells (Panel A and Panel B) and the number of recognized peptide pools (Panel C and Panel D) measured at the last available time point before (pre-pregnancy) and the first available time point after initiation of pregnancy (1st or 2nd trimesters).

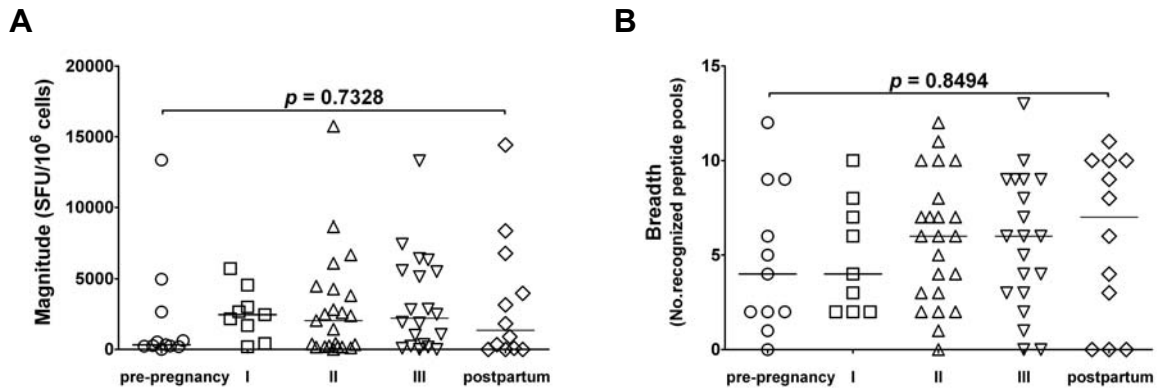
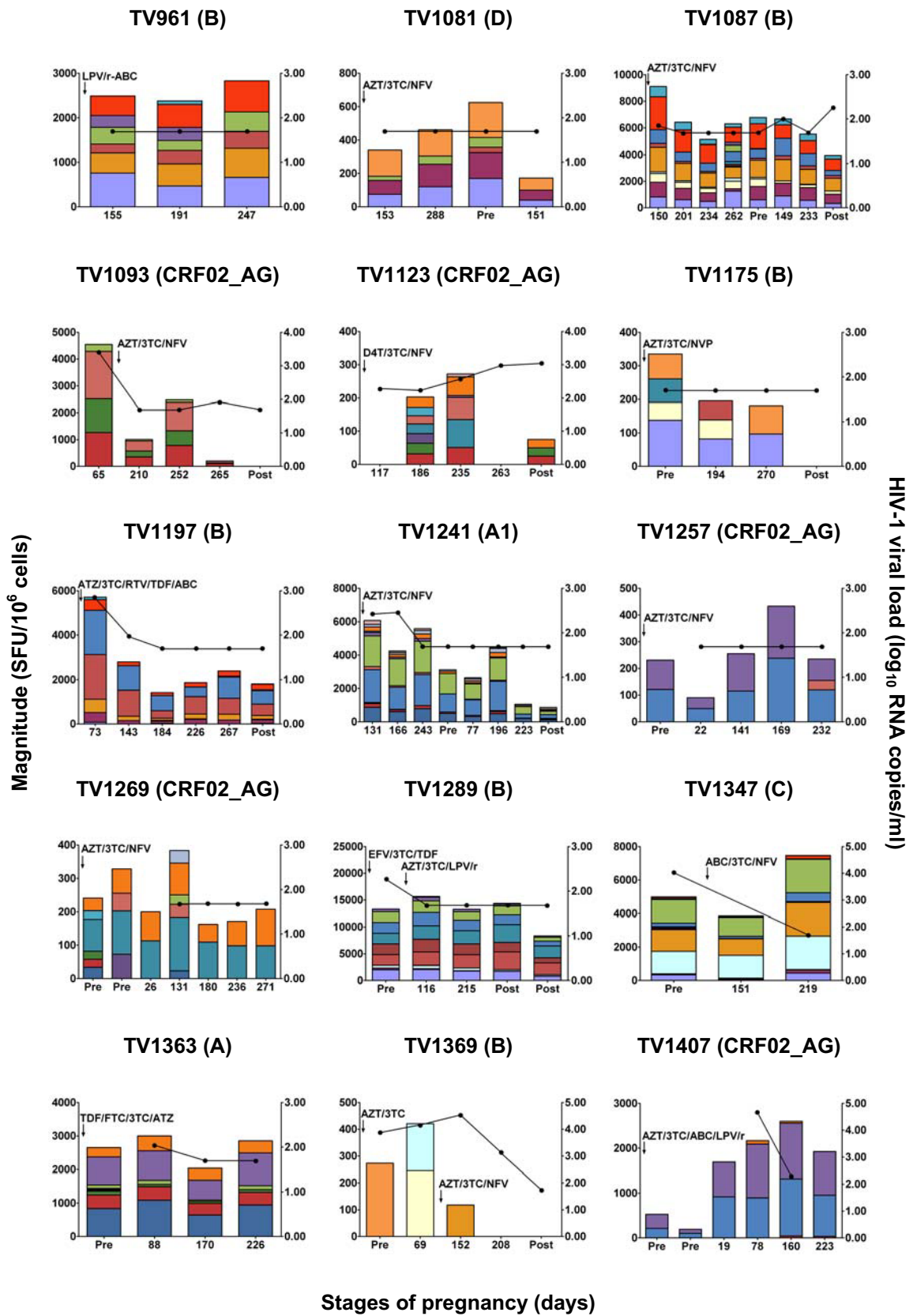


Figure 8. Magnitude and breadth of HIV-specific CTL responses before, during and after pregnancy.

Estimated date of fertilization (EDF), and the magnitude (*i.e.* the sum of responses (SFU) to all peptide pools in the matrix, divided by 2) and breadth (*i.e.* the number of peptide pools that were recognized in a given study subject) of HIV-specific CTL responses were estimated as described under Methods. Shown are the number of SFU/10⁶ cells (A) and the number of recognized peptide pools (B) measured at the last available time point before initiation of pregnancy (pre-pregnancy), during progression of pregnancy (1st, 2nd, 3^d trimesters), and after pregnancy (*postpartum*).



Stages of pregnancy (days)

HIV-1 viral load (log₁₀ RNA copies/ml)

Supplemental data. Evolution of HIV-1 peptide-specific CTL responses before, during, and after pregnancy for 15 study participants.

IFN- γ production by HIV Gag-specific CTL, gestational age, and HIV-1 viral load were determined as described under Methods. The left y-axis represents numbers of SFU/ 10^6 cells. The height of the bar reflects the total magnitude of the response to the whole peptide matrix at each time point. Each stacked bar (represented by a different color) represents the response to individual peptide pools. The right y-axis represents HIV-1 viral load. Arrows indicate the time of introduction of antiretroviral treatment.

REFERENCES

1. Lichtenstein, M.R. 1942. Tuberculin reaction in tuberculosis during pregnancy. *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* **48**:89-93.
2. Raghupathy, R., et al. 2000. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.* **15**:713-718.
3. Narita, M., Yamada, S., Kikuta, H., and Togashi, T. 2000. Reconstitution of humoral immunity during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **44**:148-152.
4. Watanabe, M., et al. 1997. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **37**:368-377.
5. Rogerson, S.J., Hviid, L., Duffy, P.E., Leke, R.F., and Taylor, D.W. 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect. Dis.* **7**:105-117.
6. Da Silva, J.A.P., and Spector, T.D. 1992. The role of pregnancy in the course and etiology of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **11**:189-194.
7. Soldan, S.S., Alvarez Retuerto, A.I., Sicotte, N.L., and Voskuhi, R.R. 2003. Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estradiol. *J. Immunol.* **171**:6267-6274.
8. St Louis, M.E., et al. 1993. Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic, and placental factors. *JAMA* **269**:2853-2859.
9. Sperling, R.S., et al. 1996. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N. Engl. J. Med.* **335**:1621-1629.
10. Bhoopat, L., et al. 2005. Chorioamniotitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype in the early gestational period. *Mod. Pathol.* **18**:1357-1864.
11. MacDonald, K.S., et al. 1998. Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J. Infect. Dis.* **177**:551-556.
12. The International Perinatal HIV Group. 1999. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1. *N. Engl. J. Med.* **340**:977-987.

13. Thorne, C., and Newell, M.L. 2004. Prevention of mother-to-child transmission of HIV infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **17**:247-252.
14. Rollins, N., et al. 2004. Preventing postnatal transmission of HIV-1 through breastfeeding: modifying infant feeding practices. *J. Acquir. Defic. Syndr.* **35**:188-194.
15. Mofenson, L.M., Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Public Health Service Task Force. 2002. U.S. Public Health Service Task Force recommendations for the use of antiretroviral drugs in pregnant women infected with HIV-1 for maternal health and for reducing perinatal HIV-1 transmission in the United States. *MMWR Recomm. Rep.* **51(RR-18)**:1-38.
16. Welles, S.L., et al. 2000. HIV-1 genotypic zidovudine drug resistance and the risk of maternal-infants transmission study. The Women and Infants Transmission Study Group. *AIDS* **14**:263-281.
17. Badri, M., et al. 2006. When to initiate highly active antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa? A South African cost-effectiveness study. *Antivir. Ther.* **11**:63-72.
18. Ioannidis, J.P., et al. 2001. Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads < 1000 copies/mL. *J. Infect. Dis.* **183**:539-545.
19. Schmitz, J.E., et al. 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ T lymphocytes. *Science* **283**:857-860.
20. Brodie, S.J., et al. 1999. In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific T cells. *Nat. Med.* **5**:34-41.
21. Koup, R.A., et al. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**:4650-4655.
22. Pantaleo, G., et al. 1994. Major expansion of CD8⁺ T lymphocytes with a predominant V β usage during the primary immune response to HIV. *Nature* **370**:463-467.
23. Soudeyns, H., et al. 1999. Selective pressure exerted by immunodominant HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses drives DNA sequence variation in the cognate epitope. *Eur. J. Immunol.* **29**:3629-3635.
24. Allen, T.M., et al. 2005. Selective escape from CD8⁺ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J. Virol.* **79**:13239-13249.

25. Brumme, Z.L., et al. 2007. Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1. *PLoS Pathog.* **3**:e94. doi:10.1371/journal.ppat.0030094.
26. Cheynier, R., et al. 1992. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur. J. Immunol.* **22**:2211-2217.
27. Rowland-Jones, S., et al. 1993. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* **341**:860-861.
28. Pillay, T., et al. 2005. Unique acquisition of cytotoxic T-lymphocyte escape mutants in infant human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **79**:12100-12105.
29. Sanchez-Merino, V., Nie, S., and Luzuriaga, K. 2005. HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses and viral evolution in women and infants. *J. Immunol.* **175**:6976-6986.
30. Pillay, T., and Phillips, R.E. 2005. Adaptive evolution in perinatal HIV-1. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **19**:211-229.
31. Jin, X., et al. 1998. Longitudinal and cross-sectional analysis of cytotoxic T lymphocyte responses and their relationship to vertical human immunodeficiency virus transmission. ARIEL Project Investigators. *J. Infect. Dis.* **178**:1317-1326.
32. Plaeger, S., et al. 1999. Decreased CD8 cell-mediated viral suppression and other immunologic characteristics of women who transmit human immunodeficiency virus to their infants. *J. Infect. Dis.* **179**:1388-1394.
33. Kalams, S.A., et al. 1999. Levels of HIV type 1-specific cytotoxic T lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* **73**:6721-6728.
34. Soudeyns, H., et al. 2000. Initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection induces rapid stabilization of the T-cell receptor β chain repertoire and reduces the level of T-cell oligoclonality. *Blood* **95**:1743-1751.
35. Spiegel, H.M., et al. 1999. Changes in frequency of HIV-1-specific cytotoxic T cell precursors and circulating effectors after combination antiretroviral therapy in children. *J. Infect. Dis.* **180**:359-368.
36. Weekes, M.P., Wills, M.R., Sissons, J.G., and Carmichael, A.J. 2006. Large HIV-specific CD8 cytotoxic T-lymphocyte (CTL) clones reduce their overall size but maintain high frequencies of memory CTL following highly active antiretroviral therapy. *Immunology* **118**:25-38.

37. Akouamba, B.S., et al. 2005. HIV-1 genetic diversity in antenatal cohort, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:1230-1234.
38. Nguyen, R.H.N., and Wilcox, A. 2005. Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms. *J. Epidemiol. Community Health* **59**:1019-1021.
39. Pantaleo, G., et al. 1997. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8⁺ T cell clones during primary infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**:9848-9853.
40. Taswell, C. 1981. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. *J. Immunol.* **126**:1614-1619.
41. Addo, M.M., et al. 2003. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1-(HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J. Virol.* **77**:2081-2092.
42. Zuniga, R., et al. 2006. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J. Virol.* **80**:3122-3125.
43. Leitner, T., et al. 2005. HIV Sequence Compendium 2005. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA.
44. Korber, B.T.M., et al. 2007. HIV Molecular Immunology 2006/2007. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA.
45. Parker, K.C., Bednarek, M.A., and Coligan, J.E. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* **152**:163-175.
46. Rammensee, H.G., Bachmann, J., Emmerich, N.N., Bachor, O.A., and Stevanovic, S. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**:213-219.
47. Seth, A., et al. 2001. Alterations in T cell phenotype and human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic after potent antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **183**:722-729.
48. Gorochov, G., et al. 2001. Down-regulation of CD8⁺ T cell-expansions in patients with HIV infection receiving highly active combination therapy. *Blood* **97**:1787-1795.

49. Betts, M.R., et al. 2001. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4⁺- and CD8⁺-T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J. Virol.* **75**:11983-11991.
50. Cao, H., et al. 1997. Cytotoxic T-lymphocyte cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades: implication for vaccine development. *J. Virol.* **71**:8615-8623.
51. Frahm, N., et al. 2004. Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J. Virol.* **78**:2187-2200.
52. Barugahare, B., et al. 2005. Human immunodeficiency virus-specific responses in adult Ugandans: patterns of cross-clade recognition. *J. Virol.* **79**:4132-4139.
53. Lichterfeld, M., et al. 2004. HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity. *AIDS* **18**:1383-1392.
54. Masemola, A., et al. 2004. Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8⁺ T cells; correlation with viral load. *J. Virol.* **78**:3233-3243.
55. Patke, D.S., et al. 2002. Association of Gag-specific T lymphocyte responses during the early phase of human immunodeficiency virus type 1 infection and lower virus load set point. *J. Infect. Dis.* **186**:1177-1180.
56. Soudeyns, H., et al. 2000. Transient T cell receptor BV-specific expansions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the early phase of pediatric human immunodeficiency virus infection: characterization of expanded cell populations by T cell receptor phenotyping. *J. Infect. Dis.* **181**:107-120.
57. Leslie, A.J., et al. 2004. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med.* **10**:282-289.
58. Rich, K.C., Siegel, J.N., Jennings, C., Rydman, R.J., and Landay, A.L. 1999. CD8⁺ lymphocytes in pregnancy and HIV infection: characterization of CD8⁺ subpopulations and CD8⁺ noncytotoxic antiviral activity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**:665-670.
59. Sun, Y., et al. 2003. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J. Immunol. Methods* **272**:23-34.

60. Safrit, J.T., et al. 2004. Immunoprophylaxis to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **35**:169-177.
61. Wright, P.F., et al. 1999. Immunization with envelope MN rgp120 vaccine in human immunodeficiency virus-infected pregnant women. *J. Infect. Dis.* **180**:1080-1088.

DISCUSSION

Notre étude porte sur l'impact de la grossesse sur les LTC VIH-spécifiques. Cette analyse longitudinale a permis de caractériser l'amplitude et la diversité de la reconnaissance antigénique des LTC VIH-spécifiques avant, pendant et après la grossesse chez 15 femmes infectées chroniquement par le VIH-1 et traitées au moyen d'agents antirétroviraux pour leur santé et pour prévenir la TME.

ELISpot IFN- γ et Gag

Nous avons choisi d'utiliser l'ELISpot IFN- γ pour évaluer la réponse LTC VIH-spécifique dirigée contre Gag. L'essai d'ELISpot est basée sur la capture d'une cytokine produite par les cellules sur une membrane et sa détection à l'aide d'anticorps monoclonaux et d'un processus enzymatique (Miyahira et al., 1995; Lalvani et al., 1997). L'ELISpot est une technique sensible et spécifique pour détecter les LTC VIH-spécifiques, comparable au marquage intracellulaire (*intracellular cytokine staining*, ICS) (McMichael et Hanke, 2002; Sun et al., 2003). Ce dernier n'a pas été retenu pour cette étude puisqu'il requiert un grand nombre de cellules, lequel ne peut être éthiquement obtenu de patientes enceintes. Actuellement, l'essai le plus couramment employé pour détecter les LTC VIH-spécifiques est l'ELISpot et plus particulièrement l'ELISpot IFN- γ (Benito et al., 2004).

L'infection par le VIH est associée à une plus grande expression des cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IFN- γ . Vraisemblablement, les lymphocytes activés et particulièrement les LTC contribuent majoritairement aux niveaux élevés d'IFN- γ observés chez les sujets infectés par le VIH (Thakar et al., 2005). Ainsi, la majorité des cellules VIH-spécifiques des patients en infection chronique produisent ces cytokines lors du contact avec leur antigène *ex vivo* (Appay et al., 2000). La capacité à sécréter de l'IFN- γ des LTC VIH-spécifiques serait relativement conservée au cours de l'infection chronique. En effet, la production d'IFN- γ serait la fonction qui résisterait le plus à l'inactivation en lien avec PD-1 (Freeman et al., 2006). Plusieurs études ont fourni l'évidence que la capacité de tuer des LTC VIH-spécifiques est associée à la capacité de produire simultanément de l'IFN- γ et du TNF- α chez les patients infectés par le VIH-1 (Sandberg et al., 2001; Lichtenfeld et al., 2004). De fait, les patients infectés par le VIH-1 qui ont un défaut dans la production d'IFN- γ par les LTC montrent aussi une détérioration de la cytotoxicité VIH-spécifique (Maino et al., 2000).

Plusieurs études ont montré que les réponses VIH-spécifiques détectées par l'ELISpot IFN- γ sont générées principalement par les LTC (Thakar et al., 2005; Fu et al., 2007). Étant donné que nous voulions nous assurer que les réponses observées étaient générées exclusivement par les LTC, il fallait soustraire les cellules T CD4⁺. En effet, ces dernières potentialisent les réponses LTC, en plus de produire elles-mêmes des réponses VIH-spécifiques. Ainsi, le fait de dépléter les cellules T CD4⁺ diminue inmanquablement les réponses VIH-spécifiques. De plus, nous anticipions des réponses LTC relativement faibles puisque les patientes étaient sous traitement antirétroviral et avaient souvent des charges virales indétectables concomitantes aux échantillons à analyser.

Dans le contexte de l'ELISpot, les lymphocytes T CD8⁺ sont stimulés par un antigène extracellulaire (peptide synthétique) présenté par le CMH-I des APC professionnelles, par la voie directe ainsi que par la présentation croisée, et produisent entre autres de l'IFN- γ . Ce sont les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs et effecteurs/mémoire qui contribuent principalement à la production d'IFN- γ . De fait, les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs expriment des niveaux élevés de perforine, ont une forte activité cytolytique et produisent des niveaux faibles de cytokines, tels que l'IL-2 et l'IFN- γ , tandis que les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoire montrent des niveaux moyens de perforine, permettant seulement une activité cytotoxique limitée, mais produisent des niveaux élevés de cytokines (Tomiyama et al., 2002).

Dans l'étude précédente de l'immunité maternelle anti-VIH-1 durant la grossesse à l'aide de tests de relargage de ⁵¹Cr, nous avons trouvé que les plus fortes fréquences de LTC VIH-spécifiques ciblaient préférentiellement la protéine virale Gag (Figure 3). De fait, Gag est l'une des protéines virales les plus immunogènes (Addo et al., 2003). De plus, une association a été mise en évidence entre la reconnaissance préférentielle de Gag par les LTC et le contrôle de la réplication virale lors d'infections aiguës et chroniques par le VIH (Edwards et al., 2002; Patke et al. 2002; Masemola et al. 2004). L'optimisation du contrôle de la réplication du VIH-1 en lien avec Gag résulterait de la sélection de mutations Gag qui altèrent la robustesse du virus ou du ciblage précoce des cellules infectées dû à l'apprêtement et à la présentation antigéniques de Gag immédiatement après l'entrée virale (Martinez-Picado et al., 2006; Sacha et al., 2007). Suite à ces observations, plusieurs études

sont consacrées au développement de vaccins basés sur Gag (Song et al., 2006; Tobery et al., 2006; Balamurugan et al., 2008 ; Kawada et al., 2008; Li et al., 2008). Éventuellement, ces vaccins pourraient être utilisés dans le contexte de la prévention de la TME du VIH-1.

Paramètres cliniques durant la grossesse

Une corrélation négative entre la charge virale et l'âge gestationnel a été observée (Figure 1A), qui peut être expliquée par la diminution de la charge virale due à l'intensification de la thérapie antirétrovirale au fur et à mesure de l'avancement de la grossesse lorsque une charge virale indétectable n'est pas atteinte. L'intensification signifie soit que le traitement antirétroviral a débuté au cours de la grossesse (n=9), qu'un antirétroviral s'est ajouté au traitement afin d'augmenter la suppression virale (n=3) ou qu'il y ait eu un changement d'antirétroviraux en cours de grossesse (n=3) en raison possiblement des effets secondaires ou de la résistance associés aux antirétroviraux (15 grossesses sur les 26 grossesses étudiées soit 57%). Effectivement, des études montrent qu'il y a une plus grande proportion de femmes infectées par le VIH-1 sous thérapie antirétrovirale qui ont une charge virale indétectable en fin de grossesse qu'en début de grossesse (Lambert et al., 2003; Newell et al., 2007).

Des études n'ont montré aucune corrélation entre le nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et l'âge gestationnel lors de grossesses normales (Sabahi et al. 1995; Kuhnert et al. 1998; Gomo et al., 2003) et lors de grossesses de femmes infectées par le VIH-1 et non-traitées (Temmerman et al., 1995). Ceci est compatible avec le fait que nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les décomptes de cellules T CD4⁺ et l'âge gestationnel (Figure 1B). Toutefois, les décomptes de cellules T CD8⁺ ont négativement corrélé avec l'âge gestationnel (Figure 1C) pour ces 36 grossesses de femmes infectées par le VIH-1. Ce résultat intéressant peut possiblement s'expliquer par le fait que ce sont des femmes infectées par le VIH-1 qui sont sous traitement antirétroviral. En effet, quoique ce sont les lymphocytes T CD8⁺ totaux qui sont comptés, on peut présumer que les variations du nombre de lymphocytes T CD8⁺ VIH-spécifiques auraient un impact sur le total puisqu'ils sont présents à des fréquences relativement élevées chez les individus en infection chronique (Altman et al., 1996; Ogg et al., 1998; Gea-Banacloche et al., 2000). Ainsi, leur nombre peut diminuer suite au traitement suppressif entraînant une charge indétectable

puisque'il leur faut une stimulation antigénique pour proliférer. De nombreuses études ont en effet montré que la HAART induisait le déclin de l'immunité cellulaire VIH-spécifique (Gray et al. 1998; Ogg et al. 1999; Pitcher et al. 1999; Soudeyns et al. 2000; Romiti et al. 2001).

Réponses LTC VIH-spécifiques

Des variations longitudinales en termes d'amplitude et de diversité de la reconnaissance antigénique des LTC VIH-spécifiques ont été observées chez toutes les patientes (Figure 5 et données supplémentaires). Ces variations ne peuvent s'expliquer seulement par l'introduction de la thérapie antirétrovirale étant donné que pour la majorité des patientes (n=11), l'initiation du traitement était antérieure à la grossesse. Toutefois, on observe un effet suppresseur sur la charge virale chez l'ensemble des patientes. Chez celles qui ont initié leur traitement antirétroviral au cours de la grossesse (n=4), l'amplitude de la réponse LTC a diminuée chez les patientes TV1093, TV1347 et TV1369 ou légèrement augmentée (15,2%) chez la patiente TV1289. Ceci est compatible avec le fait que les réponses LTC VIH-spécifiques diminuent après l'initiation de la HAART au cours de l'infection chronique (Gray et al., 1999; Kalams et al., 1999; Ogg et al., 1999).

Ces variations peuvent donc s'expliquer par un échappement viral continu et/ou par des vagues séquentielles d'expansion et de contraction des clones LTC de spécificité antigénique mixte. En effet, les expansions oligoclonales des LTC VIH-spécifiques sont caractéristiques de l'infection par le VIH (Pantaleo et al., 1994; Wilson et al., 1998). La disparition de LTC avec une spécificité particulière peut être due à un certain nombre de facteurs, y compris l'échappement viral. L'émergence fréquente de mutants d'épitopes LTC pendant des phases aiguës et chroniques de l'infection est abondamment documentée (Phillips et al., 1991; Wolinsky et al., 1996; Goulder et al., 1997; Kelleher et al., 2001; Geels et al., 2003; Feeney et al., 2004). Concrètement, les mutations d'épitopes LTC mènent donc à la perte de certains épitopes dans la population virale de l'individu. La persistance de quelques épitopes est possiblement due à la pression antivirale insuffisante des réponses LTC correspondantes (Koibuchi et al., 2005).

Cependant, une autre cause pour la disparition de certains LTC est l'épuisement clonal. Le défaut dans la production d'IFN- γ par les LTC antigène-spécifiques résulterait de l'activation chronique du système immunitaire par la réplication continue de l'antigène à concentration élevée, menant à leur exhaustion fonctionnelle progressive (Pantaleo et al., 1997; McKinney et al., 1999). Ceci est manifeste quand les cellules T ayant subi une expansion lors de l'infection aiguë, perdent la capacité de produire des cytokines, en commençant par la perte de la production d'IL-2, ensuite du TNF- α , suivi de l'IFN- γ , ce qui aboutit finalement à la délétion clonale (Wherry et al., 2003; Kapogiannis et al. 2006). Les mécanismes de l'épuisement clonal contribuent donc à la suppression de certains clones LTC VIH-spécifiques, de ce fait réduisant la taille du répertoire LTC VIH-spécifique initial et interférant potentiellement avec le contrôle à long terme de la réplication virale (Soudeyns et Pantaleo, 1999).

Quoiqu'il y ait de la variabilité dans la réponse LTC avec le temps, le degré de variation de la fréquence de LTC Gag-spécifiques chez les femmes enceintes infectées par le VIH était semblable à celui observé dans d'autres études longitudinales, portant sur des groupes d'individus infectés par le VIH-1 (Spiegel et al., 1999, Goulder et al., 2001; Koibuchi et al., 2005). Fait important, il n'y avait aucun changement unidirectionnel de la réponse LTC lors de la grossesse, à l'instar d'autres études (Jin et al., 1998).

Ces variations longitudinales de la reconnaissance antigénique des LTC VIH-spécifiques ont été confirmées chez trois patientes par une analyse plus fine faisant usage de peptides individuels (Tableau II). Ces derniers sont les mêmes que ceux formant les pools de peptides correspondants. Les essais avec les pools de peptides et ceux avec les peptides individuels se sont déroulés simultanément. En général, ces deux essais sont effectués successivement; l'analyse par déconvolution des résultats avec les pools de peptides mène à un essai testant uniquement les peptides présumés entraînant une réponse positive. Par conséquent, dans le cas présent, les essais avec les peptides individuels ont couvert l'ensemble de Gag.

Donc, des réponses relativement semblables ont été trouvées entre les analyses ELISpot utilisant les pools de peptides et les peptides testés individuellement. De fait, les

diminutions et les augmentations de l'amplitude et de la diversité corroboraient entre les deux analyses (Données non-présentées). Dans un cas, cependant, les réponses LTC obtenues avec les pools de peptides étaient plus élevées que la somme des réponses obtenues avec les peptides individuels. Un scénario probable est qu'une réponse élevée à quelques épitopes immunodominants peut augmenter la sécrétion d'IFN- γ d'autres cellules antigène-spécifiques ou de cellules non-spécifiques, e.g. les cellules NK, par l'augmentation de la concentration locale de la cytokine (Tough et al., 1996). Toutefois, une autre explication viendrait du fait qu'un peptide seul engendre généralement moins de *spots-forming units* (SFU) qu'un pool de peptides. Il va de soit qu'en utilisant le même seuil de positivité, plusieurs résultats des peptides individuels étaient donc considérés négatifs contrairement aux résultats des pools (Roederer et Koup, 2003). Pour la même raison, l'identité des épitopes reconnus par les LTC obtenue par l'analyse par déconvolution des essais des pools de peptides et l'analyse des essais avec les peptides individuels ne correspondaient pas toujours parfaitement (Données non-présentées). Par contre, pour un autre échantillon d'une autre patiente, la somme des réponses aux peptides individuels était plus élevée qu'avec les pools de peptides. Une certaine concurrence pour la même molécule HLA a pu se produire à l'intérieur des pools de peptides, dont les séquences se chevauchent. Ce phénomène reste cependant rare (Sun et al., 2003).

Plusieurs peptides identifiés ont été retrouvés dans la littérature (17/27) et certains autres ne l'ont pas été (10/27). Ceci peut s'expliquer par le fait que le clade A1 et le CRF02_AG sont relativement peu étudiés comparativement au clade B.

Réponses LTC VIH-spécifiques et contrôle de la charge virale

Nous n'avons pas observé de corrélation négative entre la charge virale et l'amplitude de la réponse LTC Gag-spécifique (Données non-présentées) (Edwards et al., 2002), certainement à cause de la prédominance de charges indétectables chez nos patientes. Les sujets ont été par conséquent classés comme ayant une charge virale indétectable avant et pendant la grossesse, ou ayant une charge virale détectable à un moment donné durant l'étude. L'amplitude et la diversité de la reconnaissance antigénique des LTC VIH-spécifiques étaient significativement plus basses chez les sujets ayant une charge virale indétectable, comparativement à ceux chez qui la charge virale était détectable (Figure 6).

Ceci est compatible au fait que le traitement antirétroviral suppressif est généralement associé à une réduction du nombre de LTC VIH-spécifiques effecteurs. De plus, ces résultats sont similaires à ceux d'une étude de l'amplitude et de la diversité des réponses LTC VIH-spécifiques chez des patients présentant une virémie supprimée comparativement aux patients avec une virémie intermittente (Karlsson et al. 2004).

Réponses LTC VIH-spécifiques lors de l'initiation et la progression de la grossesse

L'amplitude et la diversité de la reconnaissance antigénique des réponses LTC VIH-spécifiques ont été évaluées lors de l'initiation et la progression de la grossesse. Nos résultats montrent pour la première fois que l'initiation et la progression de la grossesse, à elles seules, n'ont que peu d'influence sur l'amplitude et la diversité de la reconnaissance antigénique des réponses LTC en termes de production d'IFN- γ (Figures 7 et 8). Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Jin et al., où aucun changement directionnel de la fréquence des précurseurs LTC n'a été observé pendant la grossesse. Ces résultats indiquent que les femmes infectées par le VIH conservent une immunocompétence durant leur grossesse, du moins dans le contexte d'un traitement antirétroviral efficace. Cette immunocompétence durant la grossesse des femmes enceintes infectées par le VIH a aussi été rapportée précédemment (Jin et al., 1998). Le paradoxe immunologique de la grossesse permet effectivement la coexistence d'un système immunitaire maternel efficace contre les agents infectieux et d'une tolérance locale envers le fœtus. Étant donné que le système immunitaire maternel ne semble pas subir d'immunosuppression généralisée durant la gestation, comme le montrent nos résultats, les changements immunologiques associés à la grossesse apparaîtraient principalement à l'interface materno-fœtale, créant ainsi une immunosuppression localisée (Thellin et al., 2000; Bulla et al., 2004).

Nous avons aussi évalué la réponse LTC dirigée contre un contrôle positif antigène-spécifique i.e. le pool peptidique CEF. Ce dernier est formé de 32 épitopes restreints CMH-I de 8 à 12 acides aminés de longueur, provenant de trois virus très répandus dans la population soit le cytomégalovirus (CMV), le virus Epstein Barr (EBV) et le virus influenza (Flu). Le contrôle CEF stimule la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ chez les individus possédant les molécules HLA A1, A2, A0201, A3, A11, A24, A68, A6081, B7, B8, B18, B27, B35, B44 et B0702.

Les échantillons de quatre patientes n'ont pas réagi à la stimulation par le CEF (TV961, TV1093, TV1123, TV1341). Trois de ces patientes sont d'origine africaine, la quatrième est canadienne. Il est normal de ne pas obtenir une réponse avec ce contrôle positif chez toutes les patientes. En effet, ce contrôle a d'abord et avant tout été conçu pour des analyses avec des molécules HLA définies, fréquentes chez la population caucasienne. De plus, au sein de cette même population, ce n'est pas tous les individus qui réagissent à ce pool peptidique.

Pour ce qui est des 11 autres patientes qui ont réagi positivement au contrôle CEF, nous avons observé une constance dans leurs réponses tout au long de leur(s) grossesse(s). De fait, aucune tendance globale n'a été observée lors de l'initiation et la progression de la grossesse (Figure supplémentaire). Ceci appuie notre affirmation précédente selon laquelle la grossesse n'a que peu d'effet sur l'amplitude de la reconnaissance antigénique des réponses LTC en termes de production d'IFN- γ .

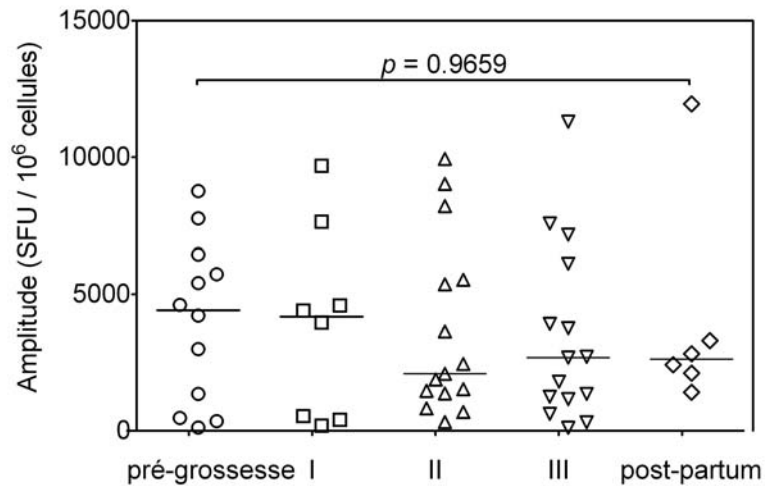


Figure supplémentaire : Amplitude de la reconnaissance antigénique des réponses LTC dirigées contre le contrôle antigène-spécifique CEF avant, pendant et après la grossesse.

La date estimée de fertilisation et l'amplitude des réponses LTC CEF-spécifiques ont été évaluées tel que décrit à la section Methods de l'article. Les nombres de SFU/10⁶ cellules ont été mesurés avant la grossesse (pré-grossesse), durant la progression de la grossesse (1^{er}, 2^e et 3^e trimestres) et après la grossesse (post-partum) chez 11 patientes.

CONCLUSION

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de vérifier l'impact de l'initiation et la progression de la grossesse sur les LTC VIH-spécifiques. Pour ce faire, nous avons caractérisé l'amplitude et la diversité de la reconnaissance antigénique des LTC VIH-spécifiques avant, pendant et après la grossesse chez des femmes infectées par le VIH-1 et traitées avec des antirétroviraux.

Très peu d'études ont mesuré la réponse LTC VIH-spécifique ou suivi ses variations longitudinales chez la femme enceinte. De plus, à notre connaissance, il s'agit de la première fois que l'immunité anti-VIH est évaluée avant et après l'initiation de la grossesse. De fait, il est exceptionnel de comparer des échantillons d'une même patiente obtenus avant et après l'initiation de la grossesse.

Vraisemblablement, malgré les changements immunologiques qui s'opèrent chez une femme enceinte, les LTC Gag-spécifiques n'ont pas modifié leur production d'IFN- γ à cause de la grossesse. Nous avons donc démontré que les femmes enceintes sont en mesure de monter une réponse LTC contre le VIH comparable à celle qu'elles ont lorsqu'elles ne sont pas enceintes, dans le contexte d'un traitement antirétroviral efficace. Une observation qui soutient la théorie d'une absence de dysfonctionnement sévère de l'immunité à médiation cellulaire durant la grossesse.

Cette étude longitudinale de la réponse LTC VIH-spécifique fournit des arguments additionnels en faveur du développement d'une immunothérapie comme stratégie pour prévenir la TME du VIH-1.

RÉFÉRENCES

Addo, M.M., Yu, X.G., Rathod, A., Cohen, D., Eldridge, R.L., Strick, D., Johnston, M.N., Corcoran, C., Wurcel, A.G., Fitzpatrick, C.A., et al. (2003) Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J. Virol.* 77, 2081-2092.

Agnellini, P., Wiesel, M., Schwarz, K., Wolint, P., Bachmann, M.F., et Oxenius, A. (2008). Kinetic and mechanistic requirements for helping CD8 T cells. *J. Immunol.* 180, 1517-1525.

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., et Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science.* 274, 94-96.

Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., et Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* 126, 32-41.

Andiman, W.A. (2002). Transmission of HIV-1 from mother to infant. *Curr. Opin. Pediatr.* 14, 78-85.

Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. (2008). Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet.* 372, 293-299.

Appay, V., Hansasuta, P., Sutton, J., Schrier, R.D., Wong, J.K., Furtado, M., Havlir, D.V., Wolinsky, S.M., McMichael, A.J., Richman, D.D., et al. (2002). Persistent HIV-1-specific cellular responses despite prolonged therapeutic viral suppression. *AIDS.* 16,161-170.

Appay, V., Nixon, D.F., Donahoe, S.M., Gillespie, G.M., Dong, T., King, A., Ogg, G.S., Spiegel, H.M., Conlon, C., Spina, C.A., et al. (2000). HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* 192, 63-75.

Autran, B., Carcelain, G., Li, T.S., Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debré P, et Leibowitch J. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science.* 1997 Jul 4;277(5322):112-6.

Baba, T.W., Trichel, A.M., An, L., Liska, V., Martin, L.N., Murphey-Corb, M., et Ruprecht, R.M., (1996). Infection and AIDS in adult macaques after nontraumatic oral exposure to cell-free SIV. *Science.* 272, 1486-1489.

Badri, M., Cleary, S., Maartens, G., Pitt, J., Bekker, L.G., Orrell, C., et Wood, R. (2006). When to initiate highly active antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa? A South African cost-effectiveness study. *Antivir. Ther.* 11, 63-72.

- Bagarazzi, M.L., Boyer, J.D., Javadn, M.H., Chattergoon, M.A., Shah, A.R., Cohen, A.D., Bennett, M.K., Ciccarelli, R.B., Ugen, K.E., et Weiner, D.B. (1999). Systemic and mucosal immunity elicited after both intramuscular and intra-vaginal delivery of HIV-1 DNA plasmid vaccines to pregnant chimpanzees. *J. Infect. Dis.* *180*, 1351-1355.
- Balamurugan, A., Lewis, M.J., Kitchen, C.M., Robertson, M.N., Shiver, J.W., Daar, E.S., Pitt, J., Ali, A., Ng, H.L., Currier, J.S. et al. (2008). Primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection during HIV-1 Gag vaccination. *J. Virol.* *82*, 2784-2791.
- Baron, S., Poast, J., Richardson, C.J., Nguyen, D., et Cloyd, M., (2000). Oral transmission of human immunodeficiency virus by infected seminalfluid and milk: a novel mechanism. *J. Infect. Dis.* *181*, 498-504.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* *220*, 868-871.
- Barret, B., Tardieu, M., Rustin, P., Lacroix, C., Chabrol, B., Desguerre, I., Dollfus, C., Mayaux, M.J., et Blanche, S. (2003). Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-1-exposed but uninfected infants: clinical screening in a large prospective cohort. *AIDS.* *17*, 1769-1785.
- Barrett, J.H., Brennan, P., Fiddler, M., et Silman, A.J. (1999). Does rheumatoid arthritis remit during pregnancy and relapse postpartum? *Arthritis Rheum.* *42*, 1219-1227.
- Bassett, M.T. (2001). Keeping the M in MTCT: women, mothers, and HIV prevention. *Am. J. Public Health.* *91*, 701-703.
- Benito, J.M., López, M., et Soriano, V. (2004). The role of CD8+ T-cell response in HIV infection. *AIDS Rev.* *6*, 79-88.
- Berges, B.K., Akkina, S.R., Folkvord, J.M., Connick, E., et Akkina, R. (2008). Mucosal transmission of R5 and X4 tropic HIV-1 via vaginal and rectal routes in humanized Rag2(-/-)gammac(-/-) (RAG-hu) mice. *Virology* *373*, 342-351.
- Berges, B.K., Wheat, W., Palmer, B., Connick, E., et Akkina, R. (2006). HIV-1 infection and CD4 T cell depletion in the humanized Rag2(-/-)gammac(-/-) (RAG-hu) mouse model. *Retrovirology* *3*, 76-90.
- Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Douek, D.C., Bonhoeffer, S., Brenchley, J.M., Casazza, J.P., Koup, R.A., et Picker, L.J. (2001). Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J. Virol.* *75*, 11983-11991.

Bhoopat, L., Khunamornpong, S., Sirivatanapa, P., Rithaporn, T., Lerdsrimongkol, P., Thorner, P.S., et Bhoopat, T. (2005). Chorioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period. *Mod. Pathol.* *18*, 1357-1364.

Blanche, S., Tardieu, M., Rustin, P., Slama, A., Barret, B., Firtion, G., Ciraru-Vigneron, N., Lacroix, C., Rouzioux, C., Mandelbrot, L., et al. (1999). Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet.* *354*, 1084-1089.

Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Peffer, N., Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. H. Hahn, M. B. Oldstone, et al. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* *3*, 205-211.

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

Brodie, S.J., Lewinsohn, D.A., Patterson, B.K., Jiyamapa, D., Krieger, J., Corey, L., Greenberg, P.D., et Riddell, S.R. (1999). In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nat. Med.* *5*, 34-41.

Brogly, S.B., Ylitalo, N., Mofenson, L.M., Oleske, J., Van Dyke, R., Crain, M.J., Abzug, M.J., Brady, M., Jean-Philippe, P., Hughes, M.D., et Seage, G.R. 3rd. (2007). In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and signs of possible mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected children. *AIDS.* *21*, 929-938.

Brossart, P., et Bevan, M.J. (1997). Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood.* *90*, 1594-1599.

Brumme, Z.L., Brumme, C.J., Carlson, J., Streeck, H., John, M., Eichbaum, Q., Block, B.L., Baker, B., Kadie, C., Markowitz, M., et al. (2008). Marked epitope- and allele-specific differences in rates of mutation in human immunodeficiency type 1 (HIV-1) Gag, Pol, and Nef cytotoxic T-lymphocyte epitopes in acute/early HIV-1 infection. *J. Virol.* *82*, 9216-9227.

Brumme, Z.L., Brumme, C.J., Heckerman, D., Korber, B.T., Daniels, M., Carlson, J., Kadie, C., Bhattacharya, T., Chui, C., Szinger, J., et al. (2007). Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1. *PLoS Pathog.* *3*, e94.

Bulla, R., Fischetti, F., Bossi, F., et Tedesco, F. (2004). Feto-maternal immune interaction at the placental level. *Lupus.* *13*, 625-629.

Butz, E. A. et Bevan, M. J. (1998). Massive expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 8, 167–175.

Carrington, M., Nelson, G.W., Martin, M.P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J.J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K., et O'Brien, S.J. (1999). HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*. 283, 1748-1752.

Casazza, J.P., Betts, M.R., Hill, B.J., Brenchley, J.M., Price, D.A., Douek, D.C., et Koup, R.A. (2005). Immunologic pressure within class I-restricted cognate human immunodeficiency virus epitopes during highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 79, 3653-3663.

Centers for Disease Control. (1981). Pneumocystis pneumonia-Los Angeles. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 30, 250-252.

Champagne, P., Ogg, G.S., King, A.S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G.P., Fleury, S., Lipp, M., et al. (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*. 410, 106-111.

Chen, Z., Luckay, A., Sodora, D.L., Telfer, P., Reed, P., Gettie, A., Kanu, J.M., Sadek, R.F., Yee, J., Ho, D.D., et al. (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, 3953-3960.

Chen, Z., Zhou, P., Ho, D.D., Landau, N.R., et Marx, P.A. (1997). Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry. *J. Virol.* 71, 2705–2714

Cheynier, R., Langlade-Demoyen, P., Marescot, M.R., Blanche, S., Blondin, G., Wain-Hobson, S., Griscelli, C., Vilmer, E., et Plata, F. (1992). Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur. J. Immun.* 22, 2211-2217.

Chigwedere, P., Seage, G.R., Lee, T.H., et Essex, M. (2008). Efficacy of antiretroviral drugs in reducing mother-to-child transmission of HIV in Africa: a meta-analysis of published clinical trials. *AIDS Res. Hum. Retro.* 24, 827-837.

Cho, M. W., Lee, M. K., Carney, M. C., Berson, J. F., Doms, R. W., et Martin, M. A. (1998). Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *J. Virol.* 72, 2509-2515.

Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 233, 343-346.

Clowse, M.E.B., Magder, L.S., Witter, F., et Petri, M. (2005). The impact of increased lupus activity on obstetric outcomes. *Arthritis Rheum.* 52, 514-521.

Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., et Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 270, 1811-1815.

Coll, .O, F.S., Floridia, M., Giaquinto, C., Grosch-Wörner, I., Guiliano, M., Lindgren, S., Lyall, H., Mandelbrot, L., Newell, M.L., Peckham, C., et al. (2002). Pregnancy and HIV infection: a European consensus on management. *AIDS* 16, S1-S18.

Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., et Baltimore, D. (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 391, 397-401.

Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M.M., Cortinovis-Tourniaire, P., et Moreau, T. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis: Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N. Engl. J. Med.* 339, 285-291.

Connor, E.M., Sperling, R.S., Gelber, R., Kiselev, P., Scott, G., O'Sullivan, M.J., VanDyke, R., Bey, M., Shearer, W., Jacobson, R.L., et al. (1994). Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N. Engl. J. Med.*, 331, 1173-1180.

Connor, R.I., Sheridan, K.E., Ceradini, D., Choe, S., et Landau, N.R. (1997). Change in coreceptor use coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* 185, 621-628.

Coovadia, H.M., Rollins, N.C., Bland, R.M., Little, K., Coutsoodis, A., Bennish, M.L., et Newell, M.L. (2007). Mother-to-child transmission of HIV-1 infection during exclusive breastfeeding: the first six months of life. *Lancet.* 369, 1107-1116.

Côté, H.C., Raboud, J., Bitnun, A., Alimenti, A., Money, D.M., Maan, E., Costei, A., Gadawski, I., Diong, C., Read, S., et al. (2008). Perinatal Exposure to Antiretroviral Therapy is Associated with Increased Blood Mitochondrial DNA Levels and Decreased Mitochondrial Gene Expression in Infants. *J. Infect. Dis.* Aug 6.

Coutsoodis, A., Pillay, K., Kuhn, L., Spooner, E., Tsai, W.Y., et Coovadia, H.M.; South African Vitamin A Study Group. (2001). Method of feeding and transmission of HIV-1 from mothers to children by 15 months of age: prospective cohort study from Durban, South Africa. *AIDS.* 15, 379-387.

Coutsoodis, A., Pillay, K., Spooner, E., Kuhn, L., et Coovadia, H.M. (1999). Influence of infant feeding patterns on early mother-to-child transmission of HIV-1 in Durban, South Africa: a prospective cohort study. *Lancet.* 354, 471-476

Dagarag, M., Ng, H., Lubong, R., Effros, R.B., et Yang, O.O. (2003). Differential impairment of lytic and cytokine functions in senescent human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 77, 3077-3083.

Dalglish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., et Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 312, 763-767.

Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., et al. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350-354.

De Clercq, E. (2004). Antivirals and antiviral strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 704-720.

De Cock, K.M., Fowler, M.G., Mercier, E., de Vincenzi, I., Saba, J., Hoff, E., Alnwick, D.J., Rogers, M., et Shaffer, N. (2000). Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA.* 283, 1175-1182.

De Jose, M.I., Ramos, J.T., Alvarez, S., Jimenez, J.L., et Muñoz-Fernández, M.A. (2001). Vertical transmission of HIV-1 variants resistant to reverse transcriptase and protease inhibitors. *Arch. Intern. Med.* 161, 2738-2739.

De Maria, A., Cirillo, C., et Moretta, L. (1994). Occurrence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T cell activity in apparently uninfected children born to HIV-1-infected mothers. *JID.* 170, 1296-1299.

Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, M.W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., et al. (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science.* 273, 1856-1862.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., et al. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 381, 661-666.

Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G., et Doms, R.W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell.* 85, 1149-1158.

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., et al. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 381, 667-673.

Dunn, D.T., Newell, M.L., Ades, A.E., et Peckham, C.S. (1992). Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. *Lancet*. 340, 585-588.

Duran, A.S., Losso, M.H., Salomón, H., Harris, D.R., Pampuro, S., Soto-Ramirez, L.E., Duarte, G., de Souza, R.S., et Read, J.S.; NISDI Perinatal Study Group. (2007). Drug resistance among HIV-infected pregnant women receiving antiretrovirals for prophylaxis. *AIDS*. 21, 199-205.

Edwards, B.H., Bansal, A., Sabbaj, S., Bakari, J., Mulligan, M.J., et Goepfert, P.A. (2002). Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the Gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J. Virol*. 76, 2298-2305.

Ekpini, E.R., Wiktor, S.Z., Satten, G.A., Adjorlolo-Johnson, G.T., Sibailly, T.S., Ou, C.Y., Karon, J.M., Brattegaard, K., Whitaker, J.P., Gnaore, E., et al. (1997). Late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Lancet*. 349, 1054-1059.

Emini, E.A., Schleif, W.A., Nunberg, J.H., Conley, A.J., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Putney, S.D., Matsushita, S., Cobb, K.E., Jett, C.M., et al. (1992). Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature*. 355, 728-730.

Eshleman, S.H., Mracna, M., Guay, L.A., Deseyve, M., Cunningham, S., Mirochnick, M., Musoke, P., Fleming, T., Glenn Fowler, M., Mofenson, L.M., et al. (2001). Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET 012). *AIDS*. 15, 1951-1957.

Esté, J.A. et Telenti, A. (2007). HIV entry inhibitors. *Lancet*. 370,81-88.

European Collaborative Study. (1992). Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 339, 1007-1012.

European Collaborative Study. (2005). Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis*. 40,458-465.

Fang, G., Burger, H., Grimson, R., Tropper, P., Nachman, S., Mayers, D., Weislow, O., Moore, R., Reyelt, C., Hutcheon, N., et al. (1995). Maternal plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA level: a determinant and projected threshold for mother-to-child transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 92, 12100-12104.

Fauci, A.S., Pantaleo, G., Stanley, S. et Weissman, D. (1996). Immunopathogenic mechanisms of HIV reproduction. *Ann. Intern. Med*. 124, 654-663.

Feeney, M.E., Tang, Y., Roosevelt, K.A., Leslie, A.J., McIntosh, K., Karthas, N., Walker, B.D., et Goulder, P.J. (2004) Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child. *J. Virol.* 78, 8927-8930.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., et Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 272, 872-877.

Fields - Virology 4e Édition (2001): par Bernard N. Fields, Peter M., MD Howley, Diane E., Ph.D. Griffin, Robert A., Ph.D. Lamb, Malcolm A., MD Martin, Bernard Roizman, Stephen E., MD Straus, David M., Ph.D. Knipe By Lippincott Williams & Wilkins Publishers.

Flexner, C. (2007). HIV drug development: the next 25 years. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6, 959-966.

Freed, E.O. (2001). HIV-1 replication. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 26, 13-33.

Freeman, G.J., Wherry, E.J., Ahmed, R., et Sharpe, A.H. (2006). Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J. Exp. Med.* 203, 2223-2227.

Fu, T.M., Dubey, S.A., Mehrotra, D.V., Freed, D.C., Trigona, W.L., Adams-Muhler, L., Clair, J.H., Evans, T.G., Steigbigel, R., Jacobson, J.M., et al. (2007). Evaluation of cellular immune responses in subjects chronically infected with HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retro.* 23, 67-76.

Gaillard, P., Verhofstede, C., Mwanyumba, F., Claeys, P., Chohan, V., Mandaliya, K., Bwayo, J., Plum, J., et Temmerman, M. (2000). Exposure to HIV-1 during delivery and mother-to-child transmission. *AIDS.* 14, 2341-2348.

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., et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature.* 397, 436-441.

Gao, F., Yue, L., Robertson, D.L., Hill, S.C., Hui, H., Biggar, R.J., Neequaye, A.E., Whelan, T.M., Ho, D.D., Shaw, G.M., et al. (1994). Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.* 68, 7433-7447.

Gao, F., Yue, L., White, A.T., Pappas, P.G., Barchue, J., Hanson, A.P., Greene, B.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., et Hahn, B.H. (1992). Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature.* 358, 495-499.

Garcia, P.M., Kalish, L.A., Pitt, J., Minkoff, H., Quinn, T.C., Burchett, S.K., Kornegay, J., Jackson, B., Moye, J., Hanson, C., et al. (1999). Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N. Engl. J. Med.* *341*, 394-402.

Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D.M., Kaplan, M.H., Gallo, R.C., et Popovic, M. (1986). The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science.* *233*, 215-219.

Gea-Banacloche, J.C., Migueles, S.A., Martino, L., Shupert, W.L., McNeil, A.C., Sabbaghian, M.S., Ehler, L., Prussin, C., Stevens, R., Lambert, L., et al. (2000). Maintenance of large numbers of virus-specific CD8⁺ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J. Immunol.* *165*, 1082-1092.

Geels, M.J., Cornelissen, M., Schuitemaker, H., Anderson, K., Kwa, D., Maas, J., Dekker, J.T., Baan, E., Zorgdrager, F., van den Burg, R., et al. (2003). Identification of sequential viral escape mutants associated with altered T-cell responses in a human immunodeficiency virus type 1-infected individual. *J. Virol.* *77*, 12430-12440.

Genoud, S., Kajumo, F., Guo, Y., Thompson, D., et Dragic, T. (1999). CCR5-Mediated human immunodeficiency virus entry depends on an amino-terminal gp120-binding site and on the conformational integrity of all four extracellular domains. *J. Virol.* *73*, 1645-1648.

Gomo, E., Vennervald, B.J., Ndhlovu, P.D., Kaestel, P., Nyazema, N.Z. et Friis, H. (2003). Reference values and predictors of white blood cell subset counts: a cross-sectional study among HIV seronegative pregnant women in Zimbabwe. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *107*, 156-162.

Goudsmit, J., et Lukashov, V.V. (1999). Dating the origin of HIV-1 subtypes. *Nature.* *400*, 325-326.

Goulder, P. J., et Watkins, D. I. (2004). HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 630-640.

Goulder, P. J., Phillips, R. E., Colbert, R. A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M. A., Giangrande, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., et al. (1997). Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. med.* *3*, 212-217.

Goulder, P.J., Altfeld, M.A., Rosenberg, E.S., Nguyen, T., Tang, Y., Eldridge, R.L., Addo, M.M., He, S., Mukherjee, J.S., Phillips, M.N., et al. (2001). Substantial differences in specificity of HIV-specific cytotoxic T cells in acute and chronic HIV infection. *J. Exp. Med.* *193*, 181-194.

Goulder, P.J., Pasquier, C., Holmes, E.C., Liang, B., Tang, Y., Izopet, J., Saune, K., Rosenberg, E.S., Burchett, S.K., McIntosh, K., et al. (2001). Mother-to-child transmission of HIV infection and CTL escape through HLA-A2-SLYNTVATL epitope sequence variation. *Immunol. Lett.* *79*, 109-116.

Gray, C. M., Schapiro, J. M., Winters, M. A., et Merigan, T. C. (1998). Changes in CD4+ and CD8+ T cell subsets in response to highly active antiretroviral therapy in HIV type 1-infected patients with prior protease inhibitor experience. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* *14*, 561-569.

Gray, C.M., Lawrence, J., Schapiro, J.M., Altman, J.D., Winters, M.A., Crompton, M., Loi, M., Kundu, S.K., Davis, M.M., Merigan, T.C. (1999). Frequency of class I HLA-restricted anti-HIV CD8+ T cells in individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *J. Immunol.* *162*, 1780-1788.

Greene, W.C., et Peterlin, B.M. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med.* *8*, 673-680.

Groothuis, T.A., et Neefjes, J. (2005). The many roads to cross-presentation. *J. Exp. Med.* *202*, 1313-1318.

Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., et van Lier, R.A. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* *186*, 1407-1418.

Hammer, S.M., Eron, J.J. Jr, Reiss, P., Schooley, R.T., Thompson, M.A., Walmsley, S., Cahn, P., Fischl, M.A., Gatell, J.M., Hirsch, M.S., et al. (2008). International AIDS Society-USA. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA.* *300*, 555-570.

Han, Y., Wind-Rotolo, M., Yang, H.C., Siliciano, J.D., et Siliciano, R.F. (2007). Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 95-106.

Hawkins, D., Blott, M., Clayden, P., de Ruiter, A., Foster, G., Gilling-Smith, C., Gosrani, B., Lyall, H., Mercey, D., Newell, M.L., et al. (2005). Guidelines for the management of HIV infection in pregnant women and the prevention of mother-to-child transmission of HIV. *HIV Med.* *6*, 107-148.

Hay, C.M., Ruhl, D.J., Basgoz, N.O., Wilson, C.C., Billingsley, J.M., DePasquale, M.P., D'Aquila, R.T., Wolinsky, S.M., Crawford, J.M., Montefiori, D.C., et al. (1999). Lack of viral escape and defective *In vivo* activation of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes in rapidly progressive infection. *J. Virol.* *73*, 5509-5519.

Haynes, B., Pantaleo, G., et Fauci, A. (1996). Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science.* *271*, 324-328.

Henderson, L., (2008). Mature HIV-1 Virion. <http://www.hiv.lanl.gov/>.

HIV Sequence Compendium 2008. Kuiken, C., Leitner, T., Foley, B., Hahn, B., Marx, P., McCutchan, F., Wolinsky, S., et Korber, B. (2008). Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico.

Holmes, E.C. (2001). On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 76, 239-254.

Iloff, P.J., Piwoz, E.G., Tavengwa, N.V., Zunguza, C.D., Marinda, E.T., Nathoo, K.J., Moulton, L.H., Ward, B.J., et Humphrey, J.H. (2005). Early exclusive breastfeeding reduces the risk of postnatal HIV-1 transmission and increases HIV-free survival. *AIDS*. 19, 699-708.

International Perinatal HIV Group. (1999). Mode of delivery and vertical transmission of HIV-1: a meta-analysis from fifteen prospective cohort studies. *Lancet* 340, 977-987.

International Perinatal HIV Group. (1999). The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1: A meta-analysis of 15 prospective cohort studies. *N. Engl. J. Med.* 340, 977-897.

International Perinatal HIV Group. (2001). Duration of ruptured membranes and vertical transmission of HIV-1: A meta-analysis from 15 prospective cohort studies. *AIDS*. 15, 357-368.

Ioannidis, J.P., Abrams, E.J., Ammann, A., Bulterys, M., Goedert, J.J., Gray, L., Korber, B.T., Mayaux, M.J., Mofenson, L.M., Newell, M.L., et al. (2001). Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads < 1000 copies/ml. *J. Infect. Dis.* 183, 539-545.

Jackson, J.B., Musoke, P., Fleming, T., Guay, L.A., Bagenda, D., Allen, M., Nakabiito, C., Sherman, J., Bakaki, P., Owor, M., et al. (2003). Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial. *Lancet*. 362, 859-868.

Jassey, C., Harrer, T., Rosenthal, T., Navia, B.A., Worth, J., Johnson, R.P., et Walker, B.D. (1993). Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes release gamma interferon, tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and TNF-beta when they encounter their target antigens. *J. Virol.* 67, 2844-2852.

Jensen, P. E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat. Immunol.* 8, 1041-1048.

Jin, X., Bauer, D.E., Tuttleton, S.E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C.E., Safrit, J.T., Mittler, J., Weinberger, L., et al. (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.* *189*, 991-998.

Jin, X., Roberts, C.G., Nixon, D.F., Cao, Y., Ho, D.D., Walker, B.D., Muldoon, M., Korber, B.T., et Koup, R.A. (1998). Longitudinal and cross-sectional analysis of cytotoxic T lymphocyte responses and their relationship to vertical human immunodeficiency virus transmission. ARIEL Project Investigators. *J. Infect. Dis.* *178*, 1317-1326.

John, G.C., Nduati, R.W., Mbori-Ngacha, D., Overbaugh, J., Welch, M., Richardson, B.A., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J., Krieger, J., Onyango, F., et al. (1997). Genital shedding of human immunodeficiency virus type-1 DNA during pregnancy: association with immunosuppression, abnormal cervical or vaginal discharge, and severe vitamin A deficiency. *J. Infect. Dis.* *175*, 57-62.

John, G.C., Nduati, R.W., Mbori-Ngacha, D.A., Richardson, B.A., Panteleeff, D., Mwatha, A., Overbaugh, J., Bwayo, J., Ndinya-Achola, J.O., et Kreiss, J.K. (2001). Correlates of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: Association with maternal plasma HIV-1 RNA load, genital HIV-1 DNA shedding, and breast infections. *J. Infect. Dis.* *183*, 206-212.

Johnson, V. A., Petropoulos, C. J., Woods, C. R., Hazelwood, J. D., Parkin, N. T., Hamilton, C. D., et Fiscus, S. A. (2001) Vertical transmission of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and continued evolution of drug resistance in an HIV-1-infected infant. *J. Infect. Dis.* *183*, 1688-1693.

Jourdain, G., Ngo-Giang-Huong, N., Le Coeur, S., Bowonwatanuwong, C., Kantipong, P., Leechanachai, P., Ariyadej, S., Leenasirimakul, P., Hammer, S., Lallemand, M.; Perinatal HIV Prevention Trial Group. (2004). Intrapartum exposure to nevirapine and subsequent maternal responses to nevirapine-based antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* *351*, 229-240.

Kägi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Bürki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., et Golstein, P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* *265*, 528-530.

Kalams, S., et Walker, B. (1998). The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* *188*, 2199-2204.

Kalams, S.A., Goulder, P.J., Shea, A.K., Jones, N.G., Trocha, A.K., Ogg, G.S., et Walker, B.D. (1999). Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* *73*, 6721-6728.

Kanki, P. J., Travers, K. U., M'boup, S., Hsieh, C. C., Marlink, R. G., Gueye-Ndiaye, A., Siby, T., Thior, I., Hernandez-Avila, M., Sankale, J. L., et al. (1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 343, 943-946.

Kantarci, S., Koulinska, I.N., Aboud, S., Fawzi, W.W., et Villamor, E. (2007). Subclinical mastitis, cell-associated HIV-1 shedding in breast milk, and breast-feeding transmission of HIV-1. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 46, 651-654.

Kapogiannis, B.G., Henderson, S.L., Nigam, P., Sharma, S., Chennareddi, L., Herndon, J.G., Robinson, H.L., et Amara, R.R. (2006). Defective IL-2 production by HIV-1-specific CD4 and CD8 T cells in an adolescent/young adult cohort. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 22, 272-282.

Kaslow, R.A., Carrington, M., Apple, R., Park, L., Muñoz, A., Saah, A.J., Goedert, J.J., Winkler, C., O'Brien, S.J., Rinaldo, C., et al. (1996). Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2, 405-411.

Kawada, M., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Iwamoto, N., Kurihara, K., Takeda, A., Moriya, C., Takeuchi, H., Akari, H., et Matano, T. (2008). Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J. Virol.* Jul 30.

Kelleher, A.D., Long, C., Holmes, E.C., Allen, R.L., Wilson, J., Conlon, C., Workman, C., Shaunak, S., Olson, K., Goulder, P., et al. (2001). Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 193, 375-386.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., et Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* 312, 767-768.

Koibuchi, T., Allen, T.M., Lichterfeld, M., Mui, S.K., O'Sullivan, K.M., Trocha, A., Kalams, S.A., Johnson, R.P., et Walker, B.D. (2005). Limited sequence evolution within persistently targeted CD8 epitopes in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 79, 8171-8181.

Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S. et Bhattacharya, T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science.* 288, 1789-1796.

Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., et Ho, D.D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* 68, 4650-4655.

Kourtis, A.P., Bulterys, M., Nesheim, S.R. et Lee, F.K. (2001). Understanding the timing of HIV transmission from mother to infant. *J. Am. Med. Assoc.* 285, 709-712.

Kuhn, L., Abrams, E.J., Palumbo, P., Bulterys, M., Aga, R., Louie, L., Hodge, T.; Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study. (2004). Maternal versus paternal inheritance of HLA class I alleles among HIV-infected children: consequences for clinical disease progression. *AIDS.* 18, 1281-1289.

Kuhn, L., Sinkala, M., Kankasa, C., Semrau, K., Kasonde, P., Scott, N., Mwiya, M., Vwalika, C., Walter, J., Tsai, W.Y., et al. (2007). High uptake of exclusive breastfeeding and reduced early post-natal HIV transmission. *PLoS ONE.* 2, e1363.

Kuhnert, M., Strohmeier, R., Stegmuller, M., et Halberstadt, E. (1998). Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 76, 147-151.

Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Charini, W.A., Nickerson, C.E., Lifton, M.A., Lord, C.I., Forman, M.A., Letvin, N.L. (1999). Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J. Immunol.* 162, 5127-5133.

Lalvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W.J., Hill, A.V., McMichael, A.J. (1997). Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J. Exp. Med.* 186, 859-865.

Lambert, J.S., McNamara, J., Katz, S.L., Fenton, T., Kang, M., VanCott, T.C., Livingston, R., Hawkins, E., Moye, J., Jr., Borkowsky, W., et al. (1998). Safety and immunogenicity of HIV recombinant envelope vaccines in HIV-infected infants and children. National Institutes of Health-sponsored Pediatric AIDS Clinical Trials Group (ACTG-218). *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 19, 451-461.

Lambert, J.S., Nogueira, S.A., Abreu, T., Machado, E.S., Costa, T.P., Bondarovsky, M., Andrade, M., Halpern, M., Barbosa, R., Perez, M. (2003). A pilot study to evaluate the safety and feasibility of the administration of AZT/3TC fixed dose combination to HIV infected pregnant women and their infants in Rio de Janeiro, Brazil. *Sex Transm. Infect.* 79, 448-452.

Leroy, V., Newell, M.L., Dabis, F., Peckham, C., Van de Perre, P., Bulterys, M., Kind, C., Simonds, R.J., Wiktor, S., et Msellati, P. (1998). International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. *Lancet.* 352, 597-600.

Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., et Oshiro, L.S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* 225, 840-842.

Lewis, P., Nduati, R., Kreiss, J.K., John, G.C., Richardson, B.A., Mbori-Ngacha, D., Ndinya-Achola, J., et Overbaugh, J. (1998). Cell-free human immunodeficiency virus type 1 in breast milk. *J. Infect. Dis.* *177*, 34-39.

Li, L., Li, H.S., Pauza, C.D., Bukrinsky, M., et Zhao, R.Y. (2005). Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res.* *15*, 923-934.

Li, T.S., Tubiana, R., Katlama, C., Calvez, V., Ait Mohand, H., et Autran, B. (1998). Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet.* *351*, 1682-1686.

Li, Z., Zhang, M., Zhou, C., Zhao, X., Iijima, N., et Frankel, F.R. (2008). Novel vaccination protocol with two live mucosal vectors elicits strong cell-mediated immunity in the vagina and protects against vaginal virus challenge. *J. Immunol.* *180*, 2504-2513.

Lichterfeld, M., Yu, X.G., Waring, M.T., Mui, S.K., Johnston, M.N., Cohen, D., Addo, M.M., Zaunders, J., Alter, G., Pae, E., et al. (2004). HIV-1 specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8⁺ T cells producing both interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* *104*, 487-494.

Lieberman, J., Shankar, P., Manjunath, N., et Andersson, J. (2001). Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood* *98*, 1667-1677. Review

Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., et Landau, N.R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* *86*, 367-377.

Lohman, B.L., Slyker, J., Mbori-Ngacha, D., Bosire, R., Farquhar, C., Obimbo, E., Otieno, P., Nduati, R., Rowland-Jones, S., et John-Stewart, G. (2003). Prevalence and magnitude of human immunodeficiency virus (HIV) type 1-specific lymphocyte responses in breast milk from HIV-1-seropositive women. *J. Infect. Dis.* *188*, 1666-1674.

Lorenzi, P., Spicher, V.M., Laubereau, B., Hirschel, B., Kind, C., Rudin, C., Irion, O., et Kaiser, L. (1998). Antiretroviral therapies in pregnancy: maternal, fetal and neonatal effects: Swiss HIV Cohort Study, the Swiss Collaborative HIV and Pregnancy Study, and the Swiss Neonatal HIV Study. *AIDS.* *12*, F241-F247.

MacDonald, K. S., Embree, J., Njenga, S., Nagelkerke, N. J., Ngatia, I., Mohammed, Z., Barber, B. H., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J., et Plummer, F. A. (1998). Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J. Infect. Dis.* *177*, 551-556.

Mackelprang, R.D., John-Stewart, G., Carrington, M., Richardson, B., Rowland-Jones, S., Gao, X., Mbori-Ngacha, D., Mabuka, J., Lohman-Payne, B., et Farquhar, C. (2008). Maternal HLA homozygosity and mother-child HLA concordance increase the risk of vertical transmission of HIV-1. *J. Infect. Dis.* *197*, 1156-1161.

Maino, V.C., Suni, M.A., Wormsley, S.B., Carlo, D.J., Wallace, M.R., et Moss, R.B. (2000). Enhancement of HIV type 1 antigen-specific CD4+T cell memory in subjects with chronic HIV type 1 infection receiving an HIV type 1 immunogen. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* *16*, 2065-2066.

Mansky, L.M., et Temin, H.M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* *69*, 5087-5094.

Martinez-Picado, J., Prado, J.G., Fry, E.E., Pfafferoth, K., Leslie, A., Chetty, S., Thobakgale, C., Honeyborne, I., Crawford, H., Matthews, P., et al. (2006). Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *80*, 3617-3623.

Martinson, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y.T. et Clegg, J.B. (1997). Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat. Genet.* *16*, 100-103.

Marzi, M., Vigano, A., Trabattoni, D., Villa, M. L., Salvaggio, A., Clerici, E., et Clerici, M. (1996). Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* *106*, 127-133.

Mascola, J.R. (2003). Defining the protective antibody response for HIV-1. *Curr. Mol. Med.* *3*, 209-216.

Masemola, A., Mashishi, T., Khoury, G., Mohube, P., Mokgotho, P., Vardas, E., Colvin, M., Zijenah, L., Katzenstein, D., Musonda, R., et al. (2004). Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load. *J. Virol.* *78*, 3233-3243.

Matano, T., Shibata, R., Siemon, C., Connors, M., Lane, H.C., et Martin, M.A. (1998). Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J. Virol.* *72*, 164-169.

Mayaux, M.J., Blanche, S., Rouzioux, C., Le Chenadec, J., Chambrin, V., Firtion, G., Allemon, M.C., Vilmer, E., Vigneron, N.C., Tricoire, J., et al. (1995). Maternal factors associated with perinatal HIV-1 transmission: the French Cohort Study: 7 years of follow-up observation. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* *8*, 188-194.

Mayaux, M.J., Dussaix, E., Isopet, J., Rekacewicz, C., Mandelbrot, L., Ciraru-Vigneron, N., Allemon, M.C., Chambrin, V., Katlama, C., Delfraissy, J.F., et al. (1997). Maternal virus load during pregnancy and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: The French Perinatal Cohort Studies. SEROGEST Cohort Group. *J. Infect. Dis.* *175*, 172-175.

McCune, J. (1995). Viral latency in HIV disease. *Cell.* *82*, 183-188.

McKinney, D.M., Lewinsohn, D.A., Riddell, S.R., Greenberg, P.D., et Mosier, D.E. (1999). The antiviral activity of HIV-specific CD8⁺ CTL clones is limited by elimination due to encounter with HIV-infected targets. *J. Immunol.* *163*, 861-867.

McMichael, A., et Hanke, T. (2002). The quest for an AIDS vaccine: is the CD8⁺ T-cell approach feasible? *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 283-291.

McMichael, A.J., et Rowland-Jones, S.L. (2001). Cellular immune responses to HIV. *Nature.* *410*, 980-987.

Meyerhans, A., Cheynier, R., Albert, J., Seth, M., Kwok, S., Sninsky, J., Morfeldt-Manson, L., Asjö, B., et Wain-Hobson, S. (1989). Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell.* *58*, 901-910.

Migueles, S.A., Laborico, A.C., Shupert, W.L., Sabbaghian, M.S., Rabin, R., Hallahan, C.W., Van Baarle, D., Kostense, S., Miedema, F., McLaughlin, M., et al. (2002). HIV-specific CD8⁺ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* *3*, 1061-1068.

Miyahira, Y., Murata, K., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Rodrigues, M.M., Zavala, F. (1995). Quantification of antigen-specific CD8⁺ T-cells using an ELISPOT assay. *J. Immunol. Methods.* *181*, 45-54.

Mocroft, A., Vella, S., Benfield, T.L., Chiesi, A., Miller, V., Gargalianos, P., d'Arminio Monforte, A., Yust, I., Bruun, J.N., Phillips, A.N., et al. (1998). Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1: EuroSIDA Study Group. *Lancet.* *352*, 1725-1730.

Mofenson, L.M., Lambert, J.S., Stiehm, E.R., Bethel, J., Meyer, W.A. 3rd, Whitehouse, J., Moye, J. Jr., Reichelderfer, P., Harris, D.R., Fowler, M.G., et al. (1999). Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 185 Team. *N. Engl. J. Med.* *341*, 385-393.

Mofenson, LM. (2002). Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Public Health Service Task Force. U.S. Public Health Service Task Force recommendations for the use of antiretroviral drugs in pregnant women infected with HIV-1 for maternal health and for

reducing perinatal HIV-1 transmission in the United States. *MMWR Recomm. Rep.* 51(RR-18):1-38.

Moore, C.B., John, M., James, I.R., Christiansen, F.T., Witt, C.S., et Mallal, S.A. (2002). Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science.* 296, 1439-1443.

Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., et Zinkernagel, R.M. (1993). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature.* 362, 758-761.

Mundy, D.C., Schinazi, R.F., Gerber, A.R., Nahmias, A.J., et Randall, H.W. Jr. (1987) Human immunodeficiency virus isolated from amniotic fluid. *Lancet.* 2, 459-460.

Musey, L., Hu, Y., Eckert, L., Christensen, M., Karchmer, T., et McElrath, M.J. (1997). HIV-1 induces cytotoxic T lymphocytes in the cervix of infected women. *J. Exp. Med.* 185, 293-303.

Musey, L., Hughes, J., Schacker, T., Shea, T., Corey, L., et McElrath, M.J. (1997). Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 337, 1267-1274.

Muthumani, K., Choo, A.Y., Hwang, D.S., Premkumar, A., Dayes, N.S., Harris, C., Green, D.R., Wadsworth, S.A., Siekierka, J.J., et Weiner, D.B. (2005). HIV-1 Nef-induced FasL induction and bystander killing requires p38 MAPK activation. *Blood.* 106, 2059-2068.

Nagata, S. et Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science.* 267, 1449-1456.

Newell, M.L., et Thorne, C. (2004). Antiretroviral therapy and mother-to-child transmission of HIV-1. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2, 717-732.

Newell, M.L., Huang, S., Fiore, S., Thorne, C., Mandelbrot, L., Sullivan, J.L., Maupin, R., Delke, I., Watts, D.H., et al. (2007). Characteristics and management of HIV-1-infected pregnant women enrolled in a randomised trial: differences between Europe and the USA. *BMC Infect. Dis.* 7, 60-70.

Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Cerundolo, V. et al. (1998). Quantitation of HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science.* 279, 2103-2106.

Ogg, G.S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Moss, P., Nowak, M.A., Monard, S., Segal, J.P., Cao, Y., Rowland-Jones, S.L., Hurley, A., et al. (1999). Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J. Virol.* 73, 797-800.

Omari, A.A., Luo, C., Kankasa, C., Bhat, G.J., et Bunn, J. (2003). Infant-feeding practices of mothers of known HIV status in Lusaka, Zambia. *Health Policy Plan.* 18, 156-162.

ONUSIDA. (2007). Le point sur l'épidémie de sida : rapport spécial sur la prévention du VIH : décembre 2007.

ONUSIDA. (2008). Le point sur l'épidémie de sida : rapport spécial sur la prévention du VIH : août 2008.

Osterberg, L., et Blaschke, T. (2005). Adherence to medication. *N. Engl. J. Med.* 353, 487-97.

Oxenius, A., McLean, A.R., Fischer, M., Price, D.A., Dawson, S.J., Hafner, R., Schneider, C., Joller, H., Hirschel, B., Phillips, R.E., et al. (2002). Human immunodeficiency virus-specific CD8⁺ T-cell responses do not predict viral growth and clearance rates during structured intermittent antiretroviral therapy. *J. Virol.* 76, 10169-10176.

Oxenius, A., Zinkernagel, R.M., et Hengartner, H. (1998). Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells upon acute versus persistent viral infection. *Immunity.* 9, 449-457.

Palella, F.J. Jr., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J., et Holmberg, S.D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 338, 853-860.

Pantaleo, G., Demarest, J.F., Soudeyns, H., Graziosi, C., Denis, F., Adelsberger, J.W., Borrow, P., Saag, M.S., Shaw, G.M., Sekaly, R.P., et al. (1994). Major expansion of CD8⁺ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature.* 370, 463-467.

Pantaleo, G., Graziosi, C., et Fauci, A. (1993). The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 328, 327-335.

Pantaleo, G., Koenig, S., Baseler, M., Lane, H.C., et Fauci, A.S. (1990). Defective clonogenic potential of CD8⁺ T lymphocytes in patients with AIDS. *J. Immunol.* 144, 1696-1704.

Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Cohen, O.J., Demarest, J.F., Montefiori, D., Orenstein, J.M., Fox, C., Schrager, L.K., et al. (1995). Studies in subject with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 332, 209-216.

Pantaleo, G., Soudeyns, H., Demarest, J.F., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Paolucci, S., Daucher, M., Cohen, O.J., Denis, F., Biddison, W.E., et al. (1997). Evidence for rapid

disappearance of initially expanded HIV-specific CD8⁺ T cell clones during primary HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *94*, 9848-9853.

Papagno, L., Spina, C.A., Marchant, A., Salio, M., Rufer, N., Little, S., Dong, T., Chesney, G., Waters, A., Easterbrook, P., et al. (2004). Immune activation and CD8⁺ T cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol.* *2*, 173-185.

Patke, D.S., Langan, S.J., Carruth, L.M., Keating, S.M., Sabundayo, B.P., Margolick, J.B., Quinn, T.C., et Bollinger, R.C. (2002). Association of Gag-specific T lymphocyte responses during the early phase of human immunodeficiency virus type 1 infection and lower virus load set point. *J. Infect. Dis.* *186*, 1177-1180.

Peeters, M., Toure-Kane, C., et Nkengasong, J. N. (2003). Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS.* *17*, 2547-2560.

Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., et Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* *271*, 1582-1586.

Petri, M. (2008). Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus.* *17*, 412-415.

Petri, M., Howard, D., et Repke, J. (1991). Frequency of lupus flare in pregnancy: the Hopkins Lupus Pregnancy Center experience. *Arthritis Rheum.* *34*, 1538-1545.

Petrovas, C., Casazza, J. P., Brenchley, J. M., Price, D. A., Gostick, E., Adams, W. C., Precopio, M. L., Schacker, T., Roederer, M., Douek, D. C., et al. (2006). PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *J. Exp. Med.* *203*, 2281-2292.

Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R., Rizza, C. R., et al. (1991). Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* *354*, 453-459.

Philpott, S.M. (2003). HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression. *Curr. HIV Res.* *1*, 217-227.

Piccinni, M.P. (2003). Role of immune cells in pregnancy. *Autoimmunity.* *36*, 1-4.

Pillay, T., Phillips, R.E. (2005). Adaptive evolution in perinatal HIV-1. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *19*, 211-229.

Pillay, T., Zhang, H.T., Drijfhout, J.W., Robinson, N., Brown, H., Khan, M., Moodley, J., Adhikari, M., Pfafferott, K., Feeney, M.E., et al. (2005). Unique acquisition of cytotoxic T-

lymphocyte escape mutants in infant human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* *79*, 12100-12105.

Pitcher, C. J., Quittner, C., Peterson, D. M., Connors, M., Koup, R. A., Maino, V. C., et Picker, L. J. (1999). HIV-1-specific CD4⁺ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat. Med.* *5*, 518-25.

Plaeger, S., Bermudez, S., Mikyias, Y., Harawa, N., Dickover, R., Mark, D., Dillon, M., Bryson, Y.J., Boyer, P.J., et Sinsheimer, J.S. (1999). Decreased CD8 cell-mediated viral suppression and other immunologic characteristics of women who transmit human immunodeficiency virus to their infants. *J. Infect. Dis.* *179*, 1388-1394.

Plesa, G., Snook, A.E., Waldman, S.A., et Eisenlohr, L.C. (2008). Derivation and fluidity of acutely induced dysfunctional CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* *180*, 5300-5308.

Poggensee, G., Schulze, K., Moneta, I., Mbezi, P., Baryomunsi, C., et Harms, G. (2004). Infant feeding practices in western Tanzania and Uganda: implications for infant feeding recommendations for HIV-infected mothers. *Trop. Med. Int. Health.* *9*, 477-485.

Polycarpou, A., Ntais, C., Korber, B.T., Elrich, H.A., Winchester, R., Krogstad, P., Wolinsky, S., Rostron, T., Rowland-Jones, S.L., Ammann, A.J., et al. (2002). Association between maternal and infant class I and II HLA alleles and of their concordance with the risk of perinatal HIV type 1 transmission. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* *18*, 741-746.

Poole, J.A., et Claman, H.N. (2004). Immunology of pregnancy. Implications for the mother. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* *26*, 161-170.

Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., Gallo, R.C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* *224*, 497-500.

Price, D. A., Goulder, P. J., Klenerman, P., Sewell, A. K., Easterbrook, P. J., Troop, M., Bangham, C. R., et Phillips, R. E. (1997). Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *94*, 1890-1895.

Raghupathy, R. (2001). Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semi. immunol.* *13*, 219-227.

Reimann, J., et Kaufmann, S.H. (1997). Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 462-469.

Ridge, J. P., Di Rosa, F. et Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* *393*, 474-478.

- Riley, L.E., et Yawetz, S. (2005). Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 32-2005. A 34-year-old HIV-positive woman who desired to become pregnant. *N. Engl. J. Med.* 353, 1725-1732.
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., et al. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* 288, 55-56.
- Roederer, M., et Koup, R.A. (2003). Optimized determination of T cell epitope responses. *J. Immunol. Methods.* 274, 221-228.
- Rollins, N., Meda, N., Becquet, R., Coutoudis, A., Humphrey, J., Jeffrey, B., Kanshana, S., Kuhn, L., Leroy, V., Mbori-Ngacha, D., et al. (2004). Preventing postnatal transmission of HIV-1 through breast-feeding: modifying infant feeding practices. *J. Acquir. Defic. Syndr.* 35, 188-194.
- Romiti, M. L., Cancrini, C., Castelli-Gattinara, G., Di Cesare, S., Ciaffi, P., Bernardi, S., De Gasperi, M. R., Halapi, E., et Rossi, P. (2001). Kinetics of the T-cell receptor CD4 and CD8 V beta repertoire in HIV-1 vertically infected infants early treated with HAART. *AIDS.* 15, 2075-2084.
- Rosenberg, E.S., Altfeld, M., Poon, S.H., Phillips, M.N., Wilkes, B.M., Eldridge, R.L., Robbins, G.K., D'Aquila, R.T., Goulder, P.J., et Walker, B.D. (2000). Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature.* 407, 523–526.
- Ross, H. A. et Rodrigo, A. G. (2002). Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J. Virol.* 76, 11715-11720.
- Rouzioux, C., Costagliola, D., Burgard, M., Blanche, S., Mayaux, M.J., Griscelli, C., et Valleron, A.J. (1995). Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model: the HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *Am. J. Epidemiol.* 142, 1330–1337.
- Rowland, B.L., Vermillion, S.T., et Soper, D.E. (2001). Scheduled cesarean delivery and the prevention of human immunodeficiency virus transmission: a survey of practicing obstetricians. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185, 327-331.
- Rowland-Jones, S.L., Nixon, D.F., Aldhous, M.C., Gotch, F., Ariyoshi, K., Hallam, N., Krull, J.S., Froebel, K., et McMichael, A. (1993). HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet.* 341, 860-861.
- Sabahi, F., Rola-Pleszczynski, M., O'Connell, S., et Frenkel, L.D. (1995). Qualitative and quantitative analysis of T lymphocytes during normal human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33, 381-393.

Sabbaj, S., Edwards, B.H., Ghosh, M.K., Semrau, K., Cheelo, S., Thea, D.M., Kuhn, L., Ritter, G.D., Mulligan, M.J., Goepfert, P.A., et al. (2002). Human immunodeficiency virus-specific CD8(+) T cells in human breast milk. *J. Virol.* 76, 7365–7373.

Sacha, J.B., Chung, C., Rakasz, E.G., Spencer, S.P., Jonas, A.K., Bean, A.T., Lee, W., Burwitz, B.J., Stephany, J.J., Loffredo, J.T., et al. (2007). Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J. Immunol.* 178, 2746-2754.

Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., et al. (1996). Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 382, 722-725.

Sanchez-Merino, V., Nie, S., et Luzuriaga, K. (2005). HIV-1-specific CD8+ T cell responses and viral evolution in women and infants. *J. Immunol.* 175, 6976-6986.

Sandberg, J.K., Fast, N.M., et Nixon, D.F. (2001). Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 167, 181-187.

Scarlatti, G., Tresoldi, E., Bjorndal, A., Fredriksson, R., Colognesi, C., Deng, H.K., Malnati, M.S., Plebani, A., Siccardi, A.G., Littman, D.R., et al. (1997). In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat. Med.* 3, 1259-1265.

Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., Ghayeb, J., et al. (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 283, 857–860.

Schwartz, O., Maréchal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., et Heard, J.M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* 2, 338-342.

Semba, R.D., Kumwenda, N., Taha, T.E., Hoover, D.R., Quinn, T.C., Lan, Y., Mtimavalye, L., Broadhead, R., Miotti, P.G., van der Hoeven, L., et Chiphangwi, J.D. (1999). Human immunodeficiency virus load in breast milk, mastitis, and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* 180, 93-98.

Seth, A., Markee, J., Hoering, A., Sevin, A., Sabath, D.E., Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Lifton, M.A., Hirsch, M.S., Collier, A.C., et al. (2001). Alterations in T cell phenotype and human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxicity after potent antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 183, 722-729.

Shankar, P., Xu, Z. et Lieberman, J. (1999). Viral-specific cytotoxic T lymphocytes lyse human immunodeficiency virus-infected primary T lymphocytes by the granule exocytosis pathway. *Blood*. *94*, 3084-3093.

Shen, L., et Rock, K.L. (2006). Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 85-91.

Shimaoka, Y., Hidaka, Y., Tada, H., Nakamura, T., Mitsuda, N., Morimoto, Y., Murata, Y., et Amino, N. (2000). Changes in cytokine production during and after normal pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* *44*, 143-147.

Simmons, G., Reeves, J.D., McKnight, A., Dejuq, N., Hibbitts, S., Power, C.A., Aarons, E., Schols, D., De Clercq, E., Proudfoot, A.E., et al. (1998). CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J. Virol.* *72*, 8453-8457.

Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F., Brun-Vézinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* *4*, 1032-1037.

Simon, V., et Ho, D.D. (2003). HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* *1*, 181-190.

Simonds, R.J., Steketee, R., Nesheim, S., Matheson, P., Palumbo, P., Alger, L., Abrams, E.J., Orloff, S., Lindsay, M., Bardeguez, A.D., et al. (1998). Impact of zidovudine use on risk and risk factors for perinatal transmission of HIV. *Perinatal AIDS Collaborative Transmission Studies. AIDS.* *12*, 301-308.

Simpson, B.J., Shapiro, E.D., et Andiman, W.A. (2000). Prospective cohort study of children born to human immunodeficiency virus-infected mothers, 1985 through 1997: trends in the risk of vertical transmission, mortality and acquired immunodeficiency syndrome indicator diseases in the era before highly active antiretroviral therapy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *19*, 618-624.

Smyth, M. J. et Trapani, J. A. (1995). Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol. Today.* *16*, 202-206.

Soldan, S.S., Alvarez Retuerto, A.I., Sicotte, N.L., et Voskuhl, R.R. (2003). Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estriol. *J. Immunol.* *171*, 6267-6274.

Song, R., Liu, S., Adams, R.J., et Leong, K.W. (2006). Enhancing efficacy of HIV gag DNA vaccine by local delivery of GM-CSF in murine and macaque models. *J. Interferon Cytokine Res.* *26*, 380-389.

Soudeyns, H., Campi, G., Rizzardì, G. P., Lenge, C., Demarest, J. F., Tambussi, G., Lazzarin, A., Kaufmann, D., Casorati, G., Corey, L., et al. (2000). Initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection induces rapid stabilization of the T-cell receptor beta chain repertoire and reduces the level of T-cell oligoclonality. *Blood*. *95*, 1743-1751.

Speck, R. F., Wehrly, K., Platt, E. J., Atchison, R. E., Charo, I. F., Kabat, D., Chesebro, B., et Goldsmith, M. A. (1997). Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J. Virol.* *71*, 7136-7139.

Sperling, R.S., Shapiro, D.E., Coombs, R.W., Todd, J.A., Herman, S.A., McSherry, G.D., O'Sullivan, M.J., Van Dyke, R.B., Jimenez, E., Rouzioux, C., et al. (1996). Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N. Engl. J. Med.* *335*, 1621-1629.

Spiegel, H.M., DeFalcon, E., Ogg, G.S., Larsson, M., Beadle, T.J., Tao, P., McMichael, A.J., Bhardwaj, N., O'Callaghan, C., Cox, W.I., Krasinski, K., et al. (1999). Changes in frequency of HIV-1-specific cytotoxic T cell precursors and circulating effectors after combination antiretroviral therapy in children. *J. Infect. Dis.* *180*, 359-368.

Sprecher, S., Soumenkoff, G., Puissant, F., et Degueudre, M. (1986). Vertical transmission of HIV in 15-week fetus. *Lancet*. *2*, 288-289.

Sripipatana, T., Spensley, A., Miller, A., McIntyre, J., Sangiwa, G., Sawe, F., Jones, D., et Wilfert, C.M. (2007). Site-specific interventions to improve prevention of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus programs in less developed settings. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *197*, S107-S112.

St Louis, M.E., Kamenga, M., Brown, C., Nelson, A.M., Manzila, T., Batter, V., Behets, F., Kabagabo, U., Ryder, R.W., Oxtoby, M., et al. (1993). Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic, and placental factors. *JAMA*. *269*, 2853-2859.

Stringer, J.S.A., Rouse, D.J., et Goldenberg, R.L. (1999). Prophylactic cesarean delivery for the prevention of perinatal human immunodeficiency virus transmission: the case for restraint. *JAMA*. *281*, 1946-1949.

Sun, Y., Iglesias, E., Samri, A., Kamkamidze, G., Decoville, T., Carcelain, G., et Autran, B. (2003). A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J Immunol. Methods*. *272*, 23-34.

Szekeres-Bartho, J. (2002). Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int. Rev. Immunol.* *21*, 471-495.

Temmerman, M., Nagelkerke, N., Bwayo, J., Chomba, E.N., Ndinya-Achola, J., et Piot, P. (1995). HIV-1 and immunological changes during pregnancy: a comparison between HIV-1-seropositive and HIV-1-seronegative women in Nairobi, Kenya. *AIDS*. *9*, 1057-1060.

Thakar, M.R., Bhonge, L.S., Lakhashe, S.K., Shankarkumar, U., Sane, S.S., Kulkarni, S.S., Mahajan, B.A., et Paranjape, R.S. (2005). Cytolytic T lymphocytes (CTLs) from HIV-1 subtype C-infected Indian patients recognize CTL epitopes from a conserved immunodominant region of HIV-1 Gag and Nef. *J. Infect. Dis.* *192*, 749-759.

The European Collaborative Study and the Swiss Mother et Child HIV Cohort Study. (2000). Combination antiretroviral therapy and duration of pregnancy. *AIDS*. *14*, 2913-2920.

The European Mode of Delivery Collaboration. (1999). Elective caesarean section versus vaginal delivery in preventing vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. *Lancet*. *353*, 1035-1039.

The Perinatal Safety Reviews Working Group. (2000). Nucleoside exposure in the children of HIV-infected women receiving antiretroviral drugs: absence of clear evidence for mitochondrial disease in children who died before 5 years of age in five United States cohorts. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *25*, 261-268.

Thellin, O., Coumans, B., Zorzi, W., Igout, A., Heinen, E. (2000). Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 731-737.

Thomson, M.M., Pérez-Alvarez, L., et Nájera, R. (2002). Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect. Dis.* *2*, 461-471.

Thorne, C., et Newell, M.L. (2004). Prevention of mother-to-child transmission of HIV infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *17*, 247-252.

Thorne, C., et Newell, M.L. (2007). HIV. *Semin. Fetal Neonatal Med.* *12*, 174-181.

Ting, J.P., et Trowsdale, J. (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell*. *109*, Suppl:S21-33.

Tobery, T.W., Dubey, S.A., Anderson, K., Freed, D.C., Cox, K.S., Lin, J., Prokop, M.T., Sykes, K.J., Mogg, R., Mehrotra, D.V. et al. (2006). A comparison of standard immunogenicity assays for monitoring HIV type 1 gag-specific T cell responses in Ad5 HIV Type 1 gag vaccinated human subjects. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. *22*, 1081-1090.

Tough, D.F., Borrow, P., Sprent, J., (1996). Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science*. *272*, 1947-1950.

Trabattoni, D., Piconi, S., Biasin, M., Rizzardini, G., Migliorino, M., Seminari, E., Boasso, A., Piacentini, L., Villa, M.L., Maserati, R., et al. (2004). Granule-dependent mechanisms of lysis are defective in CD8 T cells of HIV-infected, antiretroviral therapy-treated individuals. *AIDS*. *18*, 859-869.

Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M. R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R. S., et al. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* *12*, 1198-1202.

Tuomala, R.E., Shapiro, D.E., Mofenson, L.M., Bryson, Y., Culnane, M., Hughes, M.D., O'Sullivan, M.J., Scott, G., Stek, A.M., Wara, D., et al. (2002). Antiretroviral therapy during pregnancy and the risk of an adverse outcome. *N. Engl. J. Med.* *346*, 1863-1870.

Van de Perre, P., Simonon, A., Hitimana, D.G., Dabis, F., Msellati, P., Mukamabano, B., Butera, J.B., Van Goethem, C., Karita, E., Lepage, P., (1993). Infective and anti-infective properties of breastmilk from HIV-1-infected women. *Lancet*. *341*, 914-918.

Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., et Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 607-618.

Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., et Riddell, S.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* *333*, 1038-1044,

Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., et Mosmann, T. R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today*. *14*, 353-356.

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., et al. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. *422*, 307-312.

Weiss, R.A., et Wrangham, R.W. (1999). From Pan to pandemic. *Nature*. *397*, 385-386.

Welles, S.L., Pitt, J., Colgrove, R., McIntosh, K., Chung, P.H., Colson, A., Lockman, S., Fowler, M.G., Hanson, C., Landesman, S., et al. (2000). HIV-1 genotypic zidovudine drug resistance and the risk of maternal-infants transmission study. The Women and Infants Transmission Study Group. *AIDS*. *14*, 263-281.

Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., et Ahmend, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* *77*, 4911-4927.

Whitacre, C.C., Reingold, S.C., et O'Looney, P.A. (1999). A gender gap in autoimmunity. *Science*. 283, 1277-1278.

Wilczyński, J.R.. (2005). Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 122, 136-143.

Wilson, C.C., Brown, R.C., Korber, B.T., Wilkes, B.M., Ruhl, D.J., Sakamoto, D., Kunstman, K., Luzuriaga, K., Hanson, I.C., Widmayer, S.M., et al. (1999). Frequent detection of escape from cytotoxic T-lymphocyte recognition in perinatal human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transmission: the Ariel project for the prevention of transmission of HIV from mother to infant. *J. Virol.* 73, 3975-3985.

Wilson, J.D., Ogg, G.S., Allen, R.L., Davis, C., Shaunak, S., Downie, J., Dyer, W., Workman, C., Sullivan, S., McMichael, A.J., et al. (2000). Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS*. 14, 225-233.

Wilson, J.D., Ogg, G.S., Allen, R.L., Goulder, P.J., Kelleher, A., Sewell, A.K., O'Callaghan, C.A., Rowland-Jones, S.L., Callan, M.F., et McMichael, A.J. (1998). Oligoclonal expansions of CD8+ T cells in chronic HIV infection are antigen specific. *J. Exp. Med.* 188, 785-790.

Wolinsky, S.M., Korber, B.T., Neumann, A.U., Daniels, M., Kunstman, K.J., Whetsell, A.J., Furtado, M.R., Cao, Y., Ho, D.D., et Safrin, J.T. (1996). Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science*. 272, 537-542.

Wright, P.F., Lambert, J.S., Gorse, G.J., Hsieh, R.H., McElrath, M.J., Weinhold, K., Wara, D.W., Anderson, E.L., Keefer, M.C., Jackson, S., et al. (1999). Immunization with envelope MN rgp120 vaccine in human immunodeficiency virus-infected pregnant women. *J. Infect. Dis.* 180, 1080-1088.

Xu, X.N., Laffert, B., Screaton, G.R., Kraft, M., Wolf, D., Kolanus, W., Mongkolsapay, J., McMichael, A.J., Baur, A.S. (1999). Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J. Exp. Med.* 189, 1489-1496.

Xu, X.N., Screaton, G.R., Gotch, F.M., Dong, T., Tan, R., Almond, N., Walker, B., Stebbings, R., Kent, K., Nagata, S., et al. (1997). Evasion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by nef-dependent induction of Fas ligand (CD95L) expression on simian immunodeficiency virus-infected cells. *J. Exp. Med.* 186, 7-16.

Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J., Suresh, M., Altman, J.D., et Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188, 2205-2213.

Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A., et Roux, K. H. (2003). Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on

HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *100*, 15812-15817.

Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A., et Roux, K. H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature.* *441*, 847-852.

Zhuang, J., Jetzt, A. E., Sun, G., Yu, H., Klarmann, G., Ron, Y., Preston, B. D., et Dougherty, J. P. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J. Virol.* *76*, 11273-11282.

Zimmerli, S.C., Harari, A., Cellerai, C., Vallelian, F., Bart, P.A., et Pantaleo, G. (2005). HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *102*, 7239-7244.

