



# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



## FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



### DECANAT & DIRECTION



**DOYEN**

**M. Doudou THIAM**

**PREMIER ASSESSEUR**

**M. Cheikh Saad Bouh BOYE**

**DEUXIEME ASSESSEUR**

**M. Malick SEMBENE**

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS**

**M. Assane CISSE**

**Fait, le 17 Avril 2001**

# LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR GRADE POUR L'ANNE UNIVERSITAIRE 2000 - 2001



## I. MEDECINE

### PROFESSEURS TITULAIRES

M. José Marie	AFOUTOU	Histologie-Embryologie
M. Mamadou	BA	Pédiatrie
M. Mamadou	BA	Urologie
M. Serigne Abdou	BA	Cardiologie
M. Salif	BADIANE	Maladies Infectieuses
M. Fallou	CISSE	Physiologie
M. Moussa Fafa	CISSE	Bactériologie-Virologie
M. Fadel	DIADHIOU	Gynécologie-Obstétrique
M. Baye Assane	DIAGNE	Urologie
M. Lamine	DIAKHATE	Hématologie
*M. El Hadj Malick	DIOP	O.R.L.
Mme Thérèse MOREIRA	DIOP	Clinique Médicale
M. Sémou	DIOUF	Cardiologie
M. Souvasin	DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M Oumar	GAYE	Parasitologie
M. Mamadou	GUEYE	Neuro-Chirurgie
M. Momar	GUEYE	Psychiatrie
M. Serigne Maguèye	GUEYE	Urologie
M. Nicolas	KUAKUVI	Pédiatrie
M. Bassirou	NDIAYE	Dermatologie
M. Ibrahima Pierre	NDIAYE	Neurologie
*M. Madoune Robert	NDIAYE	Ophtalmologie
M. Mouhamadou	NDIAYE	Chirurgie Thoracique & Cardio-Vasculaire
M. Mouhamadou Mansour	NDIAYE	Neurologie
Mme Mbayang NIANG	NDIAYE	Physiologie
Pape Amadou	NDIAYE	Ophtalmologie
*M. Mamadou	NDOYE	Chirurgie Infantile
M. Abibou	SAMB	Bactériologie-Virologie
M. Mamadou	SARR	Pédiatrie
§Mme Awa Marie COLL	SECK	Maladies Infectieuses
M. Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M. Dédéou	SIMAGA	Chirurgie Générale

\* Associé

§ Détachement

M. Abdourahmane	SOW	Maladies-Infectieuses
M. Housseyn dembel	SOW	Pédiatrie
M. Mamadou Lamine	SOW	Médecine Légale
M. Moussa Lamine	SOW	Anatomie-Chirurgie Générale
*M. Cheikh Tidiane	TOURE	Chirurgie Générale
M. Meïssa	TOURE	Biochimie Médicale
M. Pape	TOURE	Cancérologie
M. Alassane	WADE	Ophthalmologie

## MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. Moussa	BADIANE	Radiologie
M. Seydou Boubakar	BADIANE	Neuro-Chirurgie
M. Mohamed Diawo	BAH	Gynécologie-Obstétrique
M. Jean Marie	DANGOU	Anatomie et Cytologie Patholog.
M. Abdarahmane	DIA	Anatomie -Chirurgie Générale
*M. Massar	DIAGNE	Neurologie
*M. Issakha	DIALLO	Santé Publique
M. Amadou Gallo	DIOP	Neurologie
M. Bernard Marcel	DIOP	Maladies Infectieuses
M. El Hadj Ibrahima	DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M. Ibrahima Bara	DIOP	Cardiologie
M. Saïd Nourou	DIOP	Médecine Interne
M. Alassane	DIOUF	Gynécologie
M. Boucar	DIOUF	Néphrologie
M. Raymond	DIOUF	O.R.L.
M. Babacar	FALL	Chirurgie Générale
M. Ibrahima	FALL	Chirurgie Pédiatrique
Mme Mame Awa	FAYE	Maladies Infectieuses
M. Oumar	FAYE	Parasitologie
Mme Sylvie SECK	GASSAMA	Biophysique
Mme Gisèle WOTO	GAYE	Anatomie Pathologique
M. Lamine	GUEYE	Physiologie
M. Abdoul Almamy	HANE	Pneumophtisiologie
*M. Mamadou Mourtalla	KA	Médecine Interne
M. Abdoul	KANE	Cardiologie
M. Victorino	MENDES	Anatomie Pathologique
M. Jean Charles	MOREAU	Gynécologie-Obstétrique
*M. Claude	MOREIRA	Pédiatrie
M. Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie-Orthopédie-Traumato.
M. Issa	NDIAYE	O.R.L.

\* Associé

M. Alain Khassim	NDOYE	Urologie
*M. Youssoupha	SAKHO	Neuro-Chirurgie
M. El Hadji	NIANG	Radiologie
M. Niama DIOP	SALL	Biochimie Médicale
Mme Bineta KA	SALL	Anesthésie-Réanimation
M. Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie
M. Moustapha	SARR	Cardiologie
M. Birama	SECK	Pédopsychiatrie
M. El Hassane	SIDIBE	Endocrinologie-Métabolisme
		Nutrition-Diabétologie
M. Ahmad Iyane	SOW	Bactériologie
*M. Papa Salif	SOW	Maladies Infectieuses
Mme Haby SIGNATE	SY	Pédiatrie
M Mouhamadou Habib	SY	Orthopédie-Traumatologie
M. Cheickna	SYLLA	Urologie
M. Omar	SYLLA	Psychiatrie
M. Doudou	THIAM	Hématologie

## MAITRES – ASSISTANTS

M. Momar Codé	BA	Neuro-Chirurgie
M. El Hadj Amadou	BA	Ophthalmologie
M. Moussa	BA	Psychiatrie
M. Boubacar	CAMARA	Pédiatrie
M. El Hadj Souleymane	CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M. Cheikh Ahmed T.	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
Mme Mariama Safiétou KA	CISSE	Clinique Médicale / Médecine Interne
		Orthopédie-Traumatologie
M. André Vauvert	DANSOKHO	Médecine Préventive
Mme Anta TAL	DIA	Pédiatrie
*M. Ibrahima	DIAGNE	Gynécologie-Obstétrique
M. Djibril	DIALLO	Dermatologie
*M. Mame Thierno	DIENG	Parasitologie
M. Yémou	DIENG	Radiologie
Mme Sokhna BA	DIOP	Anesthésie-Réanimation
Mme Elisabeth	DIOUF	Clinique Médicale/ GastroEntérologi
M. Mamadou Lamine	DIOUF	Pédiatrie
M. Saliou	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
Mme Marième BA	GUEYE	Clinique Médicale / Néphrologie
M. El Hadji Fary	KA	Dermatologie
M. Assane	KANE	Clinique Médicale / Gastro Entérologie
*M. Mouhamadou	MBENGUE	

---

\* Associé

§Mme Coura SEYE	NDIAYE	Ophtalmologie
M. Ousmane	NDIAYE	Pédiatrie
*M. Cheikh Tidiane	NDOUR	Maladies Infectieuses
M. Ndaraw	NDOYE	Neuro-Chirurgie
M. Abdoulaye	POUYE	Clinique Médicale / Médecine Interne
Mme Paule Aïda NDOYE	ROTH	Ophtalmologie
M. Abdoulaye	SAMB	Physiologie
Mme Anne Aurore	SANKALE	Chirurgie Générale
Mme Anna	SARR	Clinique Médicale / Médecine Interne
M. Doudou	SARR	Psychiatrie
M. Amadou Makhtar	SECK	Psychiatrie
M. Gora	SECK	Physiologie
*M. Masserigne	SOUMARE	Maladies Infectieuses
Mme Hassanatou TOURE	SOW	Biophysique
M. Abdourahmane	TALL	O.R.L.
M. Alé	THIAM	Neurologie

## ASSISTANTS DE FACULTE – ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX

M. Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M. Abdoulaye Séga	DIALLO	Histologie – Embryologie
M. Alassane	DIATTA	Biochimie Médicale
M. Dialo	DIOP	Bactériologie – Virologie
M. Mamadou	DIOP	Anatomie - Cancérologie
M. Moctar	DIOP	Histologie – Embryologie
M. Saliou	DIOP	Hématologie
Mme Awa Oumar TOURE	FALL	Hématologie
Mme Mame Coumba GAYE	FALL	Médecine Légale
M. Oumar	FAYE	Histologie – Embryologie
M. El hadj Alioune	LO	Anatomie Organogénèse
M. Ismaïla	MBAYE	Médecine Légale
M. Kamadore	TOURE	Médecine Préventive

---

\* Associé

§ Disponibilité

## CHEFS DE CLINIQUE – ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX

Mme Aïssata LY	BA	Radiologie
M. Maguette	BA	Chirurgie Générale
M. Mamadou Diarra	BEYE	Anesthésie - Réanimation
Mme Elisabeth FELLER	DANSOKHO	Maladies Infectieuses
Melle Marguerite Edith	DE MEDEROS	Ophtalmologie
Melle Ndèye Méry	DIA	Maladies Infectieuses
*M. Babacar	DIAO	Urologie
M. Maboury	DIAO	Cardiologie
Melle Ramatoulaye	DIAGNE	Pédiatrie
M. Bay Karim	DIALLO	O.R.L.
M. Saïdou	DIALLO	Clinique Médicale / Rhumatologie
M. Madieng	DIENG	chirurgie Générale
*M. Mamadou Moustapha	DIENG	Cancérologie
M. Charles Bertin	DIEME	Orthopédie Traumatologie
M. Rudolph	DIOP	Stomatologie
Mme Fatou SENE	DIOUF	Neurologie
M. Amadou Lamine	FALL	Pédiatrie
M. Papa Ahmed	FALL	Urologie
M. Oumar	KANE	Anesthésie - Réanimation
*M. Abdoul Aziz	KASSE	Cancérologie
M. Abdoulaye	LEYE	Médecine Interne
Mme Aminata DIACK	MBAYE	Pédiatrie
M. Philippe Marc	MOREIRA	Gynécologie - Obstétrique
M. Amadou Koura	NDAO	Neurologie
Mme Ndèye Maïmouna	NDOUR	Clinique Médicale / Médecine Interne
M. Moustapha	NDIAYE	Neurologie
Mme Marie DIOP	NDOYE	Anesthésie-Réanimation
*M. Abdou	NIANG	Clinique Médicale / Néphrologie
Mme Suzanne Oumou	NIANG	Dermatologie
Mme Fatou S. Diago	SENE	Médecine Interne I
M. Moussa	SEYDI	Maladies Infectieuses
Mme Aïda	SYLLA	Psychiatrie
M. Mamadou Habib	THIAM	Psychiatrie
Mme Nafissatou Oumar	TOURE	Pneumophtisiologie
M. Silly	TOURE	Stomatologie
Aïssatou Magatte	WANE	Ophtalmologie

\* Associé

## ATTACHES CHEFS DE CLINIQUE

M. Mamadou		COUME	Clinique Médicale / Gériatrie
M. Ahmadou		DEM	Cancérologie
Mme Dieynaba	DIA	DIOP	Pneumophtisiologie
M. Ansoumana		DIATTA	Pneumophtisiologie

## ATTACHES – ASSISTANTS

Melle Agaïcha Tamolette	ALFIDJA	Biophysique
Mme Nafissatou NDIA YE	BA	Anatomie Pathologique
Melle Fatou	DIALLO	Biochimie Médicale
Mlle Marième Hélène	DIAME	Physiologie
M. Abdou Rahmane	NDIA YE	Biophysique
*M. Papa	NDIA YE	Médecine Préventive
M Jean Marc Ndiaga	NDOYE	Anatomie
M. Ndéné Gaston	SARR	Biochimie Médicale
M. Ibrahima	SECK	Médecine Préventive
M. Babacar	FAYE	Parasitologie

---

\* Associé



## II. PHARMACIE

### PROFESSEURS TITULAIRES

M. Doudou	BA	Chimie Analytique et Toxicologie
M. Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie et Botanique
M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
M. Alioune	DIEYE	Immunologie
*M. Babacar	FAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Issa	LO	Pharmacie Galénique
*M. Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
*M. Omar	NDIR	Parasitologie

### MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. Mamadou	BADIANE	Chimie Thérapeutique
M. Mounirou	CISS	Toxicologie
*M. Aynina	CISSE	Biochimie Pharmaceutique
M. Balla Moussa	DAFFE	Pharmacognosie
Mme Aïssatou GAYE	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mme Aminata SALL	DIALLO	Physiologie Pharmaceutique
M. Pape Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique
M. Amadou	DIOUF	Toxicologie

### MAITRES – ASSISTANTS

Mme Issa Bella	BAH	Parasitologie
M. Yérim Mbagnick	DIOP	Chimie Analytique
*M. Amadou Moctar	DIEYE	Pharmacologie
Mme Rita B.	NONGONIERMA	Pharmacognosie
M. Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M.Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique

### ASSISTANTS

M. Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
M. William	DIATTA	Botanique
M. Mohamed Lamine	DIAW	Immunologie
Melle Thérèse	DIENG	Parasitologie

---

\* Associé

M. Ahmédou Bamba K.	FALL	Pharmacie Galénique
M. Djibril	FALL	Pharmacie Chimique Chimie Organique
M. Mamadou	FALL	Toxicologie
Melle Edwige	GOMIS	Pharmacognosie
M. Modou	LO	Botanique
Mme Aïssatou GUEYE	NDIAYE	Bactériologie
*M. Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique
M. Bara	NDIAYE	Chimie Analytique
*M. Mamadou	NDIAYE	Pharmacologie
Mme Maguette Dème SYLLA NIANG	NIANG	Immunologie Biochimie
Mme Philomène LOPEZ	SALL	Biochimie Pharmaceutique
*M. Mamadou	SARR	Physiologie Pharmaceutique
M. Guata Yoro	SY	Pharmacologie
*M. Elimane Amadou	SY	Chimie Générale et Minérale
M. Alassane	WELE	Chimie Physique

## ATTACHES

Mme Amy THIAM	FALL	Chimie Analytique
M. Mor	GUEYE	Physiologie Pharmaceutique
M. Pape Madièye	GUEYE	Biochimie Pharmaceutique
M. Sarra	NGOM	Pharmacie Galénique
Mme Oumou BARRY	KANE	Toxicologie
M. Modou Oumy	KANE	Physiologie Pharmaceutique

---

\* Associé

# III. CHIRURGIE DENTAIRE

## PROFESSEURS TITULAIRES

M. Ibrahima	BA	Pédodontie-Prévention
# Mme Ndioro	NDIAYE	Odontologie Préventive & Sociale

## MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

*M. Boubacar	DIALLO	Chirurgie Buccale
M. Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
Mme Charlotte Faty	NDIAYE	Chirurgie Buccale
M. Malick	SEMBENE	Parodontologie

## MAITRES ASSISTANTS

M. Daouda	CISSE	Odontologie Préventive & Sociale
*M. Falou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
Mme Fatou	DIOP	Pédodontie-Prévention
Mlle Fatou	GAYE	Odontologie Conser. Endodontie
M. Abdou Wahab	KANE	Odontologie Conser. Endodontie
*M. Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire
Mme Soukèye DIA	TINE	Chirurgie Buccale
M. Abdoul Aziz	YAM	Pédodontie – Prévention

## ASSISTANTS DE FACULTE

M. Abdou	BA	Chirurgie Buccale
Mme Aïssatou TAMBA	BA	Pédodontie-Prévention
Mme Khady DIOP	BA	Orthopédie Dento-Faciale
M. Henri Michel	BENOIST	Parodontologie
Mme Adam Awa Marie Seck	DIALLO	Parodontologie
*M. Khalifa	DIENG	Odontologie Légale
*M. Lambane	DIENG	Prothèse Dentaire

---

\* Associé

# Détachement

M. Cheikh Mouhamadou M.	LO	Odontologie Préventive & Sociale
*M. Malick	MBAYE	Odontologie Conser. Endodontie
M. Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
M. Cheikh	NDIAYE	Prothèse Dentaire
M. Paul Débé Amadou	NIANG	Chirurgie Buccale
M. Farimata Youga DIENG	SARR	Matières Fondamentales
M. Babacar	TOURE	Odontologie Conser. Endodontie
M. Saïd Nour	TOURE	Prothèse Dentaire

## ATTACHES

M. Abdoulaye	DIOUF	Parodontologie
M. Babacar	FAYE	Odontologie Conser. Endodontie
M. Daouda	FAYE	Odontologie Préventive & Sociale
M. Malick	FAYE	Pédodontie
M. El Hadj Babacar	MBODJ	Prothèse Dentaire
M. Mohamed	SARR	Odontologie Conser. Endodontie
M. Fatoumata DIOP	THIAW	Odontologie Conser. Endodontie
M. Oumar Harouna	SALL	Matières Fondamentales

---

\* Associé

**A mon feu père Onanga Urbain**

**A ma mère Ibouka Christine**

**A ma famille**

**A mon épouse Patricia**

**A Laïtsi**

**A Adoni**

**A mes amis**

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Professeur Doudou BA, qui a accepté d'être le président de jury de cette thèse. Je vous adresse toute mon admiration pour la rigueur scientifique dont vous avez su faire montre durant nos années passées à la faculté de Pharmacie.

A mon directeur de thèse le Professeur Mboup, je ne sais pas si je saurais trouver les mots pour vous remercier. Vous m'avez fait confiance avant que j'aie confiance en moi, à vos côtés j'ai appris la rigueur scientifique, l'humilité, l'esprit critique et aussi l'esprit pratique qui me manquait douloureusement à mes débuts. Pour tous ces moments de bonheur, de bienveillance et de sympathie, vous garderez toujours ma reconnaissance et ma profonde amitié.

A Madame le Professeur Françoise Barré Sinoussi, j'exprime toute ma gratitude pour m'avoir accepté dans votre laboratoire. Une partie importante de ce travail a été réalisée grâce à vos bons soins et à votre dévotion pour la science. Les discussions enthousiastes, constructives et positives que nous avons pu avoir m'ont poussé à aller encore plus loin dans la réflexion effectuée sur ce travail.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Brun-Vezinet pour ses conseils et son soutien tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier plus particulièrement le Professeur François Simon pour sa confiance, son aide et son intérêt tout au long de ce travail. Sans lui, ce travail aurait connu une fin prématurée. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance au Docteur Roger Legrand pour avoir apporté son auguste contribution dans l'élaboration de ce travail et avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie vivement Le Docteur Pierre Roques pour la confiance qu'il m'a constamment accordée durant cette dernière année. Grâce à son enthousiasme, sa grande liberté et sa rigueur scientifique, les critiques et les suggestions de fond, de formes qu'il a apporté dans la rédaction de ce manuscrit, j'ai appris la méthode et la rigueur scientifique nécessaire à la poursuite de ma carrière.

J'exprime toute ma gratitude au Docteur Michaella Muller-Tritwin pour sa contribution scientifique, ses conseils, ses encouragements et son soutien. A vos côtés, et aux moments des déjeuners conviviaux que nous avons partagé ensemble, j'ai pris conscience de l'importance de la notion de l'esprit d'équipe. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

Je remercie le Docteur Christopher Kornefeld, pour sa patience, sa disponibilité, son aide sur le plan technique et pour tous les moments d'amitié passé ensemble.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux Docteurs Elie Mavoungou, Virginie Poaty-Mavoungou, Ivona Pandrea et Christian Apetrei pour leur contribution scientifique, leurs conseils précieux, l'aide qu'ils m'ont apporté dans la réalisation de ce travail et la mise en forme de cette thèse. Leurs encouragements m'ont souvent permis de surmonter les moments difficiles fréquents dans la carrière d'un jeune chercheur.

Au Docteur Daniel Drevet Directeur Général du CIRMF, au Professeur Blot et toute l'équipe du conseil scientifique, ainsi qu'à tout l'ensemble du personnel du CIRMF, j'exprime mes plus vifs remerciements.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Alain Jean Georges et le Docteur Marie Claude Georges, dont la rencontre a été déterminante dans ma vie professionnelle. Merci de m'avoir accueilli dans ce laboratoire et de m'avoir fait confiance. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie chaleureusement le Docteur Lansoud Soukate pour sa bienveillance et sa sympathie. Sans vous, mes activités de recherche auraient pu rapidement prendre fin. A mes moments de doutes, vos conseils et encouragements ont été pour moi des moments de transmission de force tranquille et d'apaisement. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Mes plus vifs remerciements à Mesdames Maria Makuwa et Sandrine Souquière pour tout le support technique, leurs conseils et critiques qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements, plus particulièrement aux Docteurs Lamine Diaw, Ndèye Coumba Touré Kane et tout l'ensemble du laboratoire de bactériologie et virologie de l'hôpital Le Dantec, pour leur accueil chaleureux, leur sympathie, leurs conseils et leur précieuse aide dans la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement avec une attention particulière pour les Docteurs Eric Leroy, Sylvain Baize, Benjamin Ollomo, Lucas Sica et leurs épouses, Eric Landry, Madame Georgette Azzibrouck et son époux, Madame Aïcha Sall, Issa et Marie Thérèse Bedjabaga, Paul Ngari, Augustin, sans oublier toutes les équipes de la comptabilité, des services techniques et du LAM.

ABREVIATIONS .....	9
INTRODUCTION.....	11
<b>I. GENERALITES SUR LES LENTIVIRUS DES PRIMATES .....</b>	<b>11</b>
1. LA DECOUVERTE DU SIDA ET DES LENTIVIRUS ASSOCIES .....	11
2. RAPPEL TAXONOMIQUE .....	12
3. STRUCTURE ET ORGANISATION GENOMIQUE DES LENTIVIRUS.....	13
<b>II. LES MECANISMES MOLECULAIRES GENERATEURS DE LA DIVERSITE ET LES METHODES D'ETUDES.....</b>	<b>17</b>
1. MECANISMES DE VARIABILITE DES LENTIVIRUS SIMIENS .....	17
1.1. La faible fidélité de la RT et la forte réplication virale.....	17
1.2. Recombinaisons .....	18
1.3. Pressions de sélection et quasi-espèces.....	18
2. METHODES D'ETUDE DE LA DIVERSITE .....	19
2.1 Sérotype.....	19
2.2 Génotype .....	20
3. CONSEQUENCES DE LA DIVERSITE DES LENTIVIRUS SIMIENS .....	22
3.1. Répercussions sur le diagnostique.....	22
3.1.1 Répercussions sur le diagnostique sérologique .....	22
3.1.2 Répercussions sur le diagnostic virologique.....	23
3.2. Impact sur la sensibilité aux antirétroviraux .....	24
3.3. Influence sur l'utilisation des co-récepteurs .....	25
3.4. Effets sur la transmissibilité.....	26
3.5. Influence sur la pathogénie .....	27
3.6. Conséquences vaccinales .....	29
<b>III. EVOLUTION DES SIV ET LIGNEES DE LENTIVIRUS DE PRIMATES.....</b>	<b>30</b>
1. L'EVOLUTION DES PRIMATES NON-HUMAINS .....	30
2. RELATIONS ENTRE LES VIRUS DES PRIMATES .....	33
2.1. La lignée SIVcpz/VIH-1 .....	34
2.2. La lignée SIVsm/SIVmac/VIH-2.....	37
2.3. La lignée SIVagm .....	39
2.4. La lignée SIVsyk.....	41
2.5. La lignée SIVlhoest.....	41
2.6. La lignée SIVcol .....	42
2.7. Les lentivirus non-classifiés .....	44
2.7.1. SIVrcm, SIVmnd-2, SIVdrill.....	44
2.7.2. SIVtal.....	46
2.7.2. SIVdeb, SIVmona, SIVwol, SIVasc.....	46
<b>IV. LES INFECTIONS LENTIVIRALES CHEZ LES PRIMATES NON HUMAINS.....</b>	<b>47</b>
1. HISTOIRE NATURELLE COMPAREE DE L'INFECTION LENTIVIRALE CHEZ L'HOMME ET LE SINGE... 47	47
1.1 Rappel de la pathogenèse lentivirale.....	47
1.2 Les différentes phases de l'infection VIH.....	48
1.2.1 La primo-infection.....	48
1.2.2 La phase chronique asymptomatique.....	49
1.2.3 La phase terminale.....	49
1.3. Facteurs pronostiques.....	50
1.4. Les différents profils d'évolution.....	51
1.4.1 Les progresseurs rapides.....	51
1.4.2. Les asymptomatique à long terme .....	52
1.5. Pathogénèse de l'infection lentivirale chez les primates.....	52



1.5.1. Modèles simiens d'infection pathogène.....	54
1.5.1.1 - Modèle d'infection chez le macaque SIVmac/SIVsm.....	54
1.5.1.2 Autres modèles d'infection chez le macaque :	58
L'infection par VIH-1.....	58
L'infection par VIH-2.....	60
L'infection par SIVsm.....	60
L'infection par SIVagm.....	60
L'infection par SIVhoest.....	61
1.5.1.3 Modèle d'infection chez le babouin.....	61
1.5.1.4 Modèle des virus chimères.....	61
1.5.2. Modèles simiens d'infection non pathogène.....	62
1.5.2.1 L'infection lentivirale du chimpanzé :	62
L'infection naturelle par SIVcpz.....	63
L'infection expérimentale par VIH-1.....	63
1.5.2.2 L'infection lentivirale des singes verts.....	65
1.5.2.3 Modèle d'infection chez le mangabey.....	67
1.5.3 . Autres exemples d'infection lentivirale naturelle des primates non humains.....	68
<b>2. LES MECANISMES INFLUENÇANT LA PATHOGENESE DU SIDA.....</b>	<b>69</b>
2. 1. La physiopathologie de l'infection pathogène à VIH ou SIV.....	70
2.1.1. Dissémination du virus et infection précoce.....	70
2.1.2. Déplétion en cellules T CD4 <sup>+</sup> .....	71
2. 2 Le rôle des facteurs viraux.....	72
2. 2.1 Variations génétiques et échappement à la réponse immune.....	72
2. 2.2 Rôle des déterminants viraux génétiques dans la pathogénèse.....	73
2. 3 Le rôle des facteurs de l'hôte.....	75
2. 3.1 Les réponses immunes humorales et cellulaires.....	75
2. 3.1.1 Les réponses humorales.....	75
2. 3.1.2 Les réponses cellulaires.....	76
2. 3.1.2.1 Les différences quantitatives des sous populations lymphocytaires chez les primates.....	76
2. 3.1.2.2 Les réponses CTL.....	76
2. 3.1.2 3.Cytokines et réplication des lentivirus.....	78
2. 3.1.2 4 La réponse NK.....	79
2. 3.1.2 5 Les réponses suppressives.....	80
2.3.2 Les facteurs génétiques.....	81
2.3.2.1 Les corécepteurs.....	81
2.3.2.2 Les marqueurs alléliques.....	82
2.4. Les facteurs exogènes et la réplication du VIH.....	84
<b>3. LES MECANISMES HYPOTHETIQUES DE LA RESISTANCE A L'INFECTION.....</b>	<b>84</b>
<b>V. HISTOIRE NATURELLE DES SIVMND ISOLES DES MANDRILLS.....</b>	<b>86</b>
1.HISTOIRE NATURELLE DE L'ESPECE MANDRILLUS SPHINX.....	86
2. LES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DES MANDRILLS.....	88
3. CARACTERISATION DU SIVMND-1 ET SIVMND-2.....	91
<b>OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>95</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>97</b>
<b>I. MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>97</b>
1. SUJETS ET INFECTION.....	97
1.1- Choix des sujets.....	97
1.1.1 Pour les études in vitro.....	97
1.1.2 L'infection expérimentale.....	98
1.2- Stock viral.....	98

1.2.1 Pour les infections in vitro.....	98
1.2.2 Pour les infections in vivo .....	98
1.3- Primo-infection des animaux .....	100
1.3.1 Inoculum.....	100
1.3.2 Animaux .....	100
1.4- Prélèvements.....	101
1.4.1 Plasma.....	101
1.4.2 Cellules du sang périphérique.....	101
1.4.3 Ganglions.....	101
1.4.4 Lavages broncho-alvéolaire (LBA) .....	102
1.5. Cellules de lignées.....	102

## II. METHODES..... 102

1. TECHNIQUES SEROLOGIQUES .....	102
1.1- Technique ELISA .....	103
1.1.1 Tests commerciaux .....	103
1.1.2 Test peptides SIVmnd gp41 et V3.....	103
1.2. Technique du Western-Blot .....	104
Interprétation des résultats .....	105
2. TECHNIQUES VIROLOGIQUES .....	105
2.1. Techniques de base de cultures cellulaires.....	106
2.1.1 Cultures primaires.....	106
2.1.1.1 Séparation des lymphocytes T .....	106
2.1.1.2 Mise en Culture.....	106
2.1.1.2.1 Culture directe des PBMC.....	106
2.1.1.2.2 Coculture avec des PBMC .....	106
2.1.1.2.3 Coculture avec des lignées .....	107
2.1.2 Entretien des cultures.....	107
2.2. Congélation et décongélation des cellules.....	107
2.2. 1 Congélation.....	107
2.2. 2 Décongélation.....	108
2.3. Isolement des virus SIV .....	108
2.3.1 Culture directe .....	108
2.3.2 Cocultures avec des PBMC .....	108
2.3. 3 Cocultures avec des cellules de lignées .....	109
2.4. Méthodes de détection du virus dans le plasma et les surnageants de cultures.....	109
2.4.1 Dosage de l'antigène p27 .....	109
2.4.2 Dosage de l'antigène p24 .....	110
2.4.3. Mesure de l'activité transcriptase inverse .....	110
2.5. Technique de virémie quantitative par coculture .....	111
2.6. Technique de titrage d'un stock de SIV sur lignée .....	112
2.7. Technique d'infection in vitro des cellules par SIV .....	113
2.8. Technique d'infection in vitro des cellules Ghost exprimant les co-récepteurs .....	114
3. TECHNIQUES D'IMMUNOPHENOTYPAGE.....	115
3.1. Sur sang total.....	115
3.2. Sur PBMC et lymphocytes des ganglions .....	115
4. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE .....	116
4.1. Extraction d'acides nucléiques.....	116
4.1.1 Extraction de l'ADN et de L'ARN viral.....	116
4.1.2 Extraction d'ADN par la technique au phénol-chloroforme .....	116
4.1.3 Extraction de plasmides.....	117
4.1.4 Extraction d'ARN à partir du plasma .....	117
4.2. Amplification génique (PCR).....	117
4.2.1 Oligonucléotides.....	117
4.2.2 Réactions d'amplification.....	118

4.2.3 PCR « nichée » .....	118
4.2.4 Construction du standard externe .....	119
4.3. Quantification par RT-PCR.....	120
4.4. Détection des produits d'amplification .....	121
<b>RESULTATS</b> .....	122
<b>1. CARACTERISATION DES PARAMETRES BIOLOGIQUES DU MANDRILLUS SPHINX DU CDP</b> .....	122
ARTICLE 1: .....	126
<b>2. CARACTERISATION ET PHENOTYPAGE DU SIVMND</b> .....	128
ARTICLE 2: .....	128
ARTICLE 3: .....	129
1.1. PREPARATION DU STOCK VIRAL.....	130
1.2. CINETIQUE DE LA CHARGE VIRALE, DE LA REPONSE IMMUNE HUMORALE ET CELLULAIRE.....	131
ARTICLE 4: .....	131
1.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES DU SUIVIE CLINIQUE, VIROLOGIQUES ET BIOLOGIQUES AU COURS DE LA PRIMO-INFECTION SIVMND-1 CHEZ LE MANDRILL: .....	133
1.4. MARQUEURS COMPLEMENTAIRES DE LA REPONSE CELLULAIRE AU COURS DE LA PRIMO-INFECTION SIVMND-1 CHEZ LE MANDRILL.....	139
1.5. LE VIRUS SIVMND-1 DE PRIMO-INFECTION UTILISE RESPECTIVEMENT LE CCR5, PUIS BOB ET BONZO.....	141
1.6. ETUDE DE LA CHARGE VIRALE, DE LA REPONSE IMMUNE HUMORALE ET CELLULAIRE DURANT LA PHASE CHRONIQUE SIVMND-1.....	142
ARTICLE 5: .....	145
<b>DISCUSSION</b> .....	147
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	154
<b>ANNEXES</b> .....	157
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	161

## ABREVIATIONS

EIA	Enzyme immuno-assay
3TC	3' Thiacytidine ou lamivudine
ADN ou DNA	Acide desoxyribonucléique
ALT ou LTS	Asymptomatique à long terme
ARN ou RNA	Acide ribonucléique
ARV	Antirétroviral
AZT	Azidothymidine
CA	Capside
CCR5	Chemiokine receptor 5
CD4	Cluster différenciation
CDC	Center for disease control
CIRMF	Centre International de Recherche Médical de Franceville
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CRF	Circulating recombinant form
CTL ou LCT	cytotoxique T lymphocytes.
CTL	Cytotoxique T Lymphocyte
CXCR4	chemokine receptor 4
d4T	analogue de la déoxythymidine (Stavudine)
ddC	didéoxycytosine (Zalcitabine)
ddI	didéoxy-inosine (Didanosine)
DO	Densité Optique
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent assay
env	enveloppe
Gag	group antigen
gp	glycoprotéine
HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HIV	Human immunodeficiency virus
HMA	Heteroduplex Mobility Assay
HTLV	Human T lymphotropic virus
HTLV	Human T-Lympotropic Virus
IBNG	Ibadan Nigeria
IDV	Indinavir
Ig	Immunoglobuline
IN	Intégrase
INNRT	Inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase
INRT	Inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase
IP	Inhibiteurs de la protéase
Kb	Kilobase
LAV	Lymphadenopathy virus
LTR	long terminal repeat
MA	matrice
MIP	Macophage inflammatory protein
ml	millilitre
MNS	Mutation non synonyme
MS	Mutation synonyme
NASBA	Nucleic acid sequence based amplification
NC	nucléoprotéine
Nef	negativity expression factor
NFkB	Facteur nucléaire Kappa B
NSI	non syncytium inducing
NVP	Nevirapine
OMS	Organisation mondial de la santé
Pb	Paire de base
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase chain reaction

Pol  
PR  
R  
RANTES  
rpm  
RSV  
RT  
SFV  
SI  
SIDA  
SIV  
SNV  
Tat  
TCID<sub>50</sub>  
TI  
TM  
UDI  
Vif  
VIH  
Vp  
WB

polymérase  
protéase  
Receptor  
Regulated on activation normal T cell expressed/secreted  
round per minute  
Rous Sarcoma Virus  
Reverse transcriptase  
Simian Foamy virus  
Syncytium inducing  
Syndrome d'immunodéficience acquise  
simian immunodéficience virus  
Spleen Necrotic Virus  
transactivator of transcription  
Tissue cell dose infectious  
transcriptase inverse  
trans membranaire  
Utilisateurs de Drogues Injectables  
virion infectivity factor  
virus de l'immunodéficience humaine  
viral protein  
Western Blot



**INTRODUCTION**

# INTRODUCTION

## I. Généralités sur les lentivirus des primates

### 1. La découverte du SIDA et des lentivirus associés

En 1981, un tableau clinique inhabituel était observé chez de jeunes homosexuels américains ; il était caractérisé par des infections et cancers opportunistes associés à une immunodéficience sévère. La description d'autres cas parmi les utilisateurs de drogues injectables (UDI) aboutit à individualiser un nouveau syndrome : le SIDA (*Syndrome d'immunodéficience acquise*), marqué par une altération profonde du système immunitaire. L'agent étiologique fut isolé pour la première fois en 1983 à l'Institut Pasteur et appelé LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*) (1) ; en 1984, aux Etats Unis, Popovic et al. isolaient le même virus qu'ils appelaient HTLV-III (*Human T-Lymphotropic Virus type III*) (2).

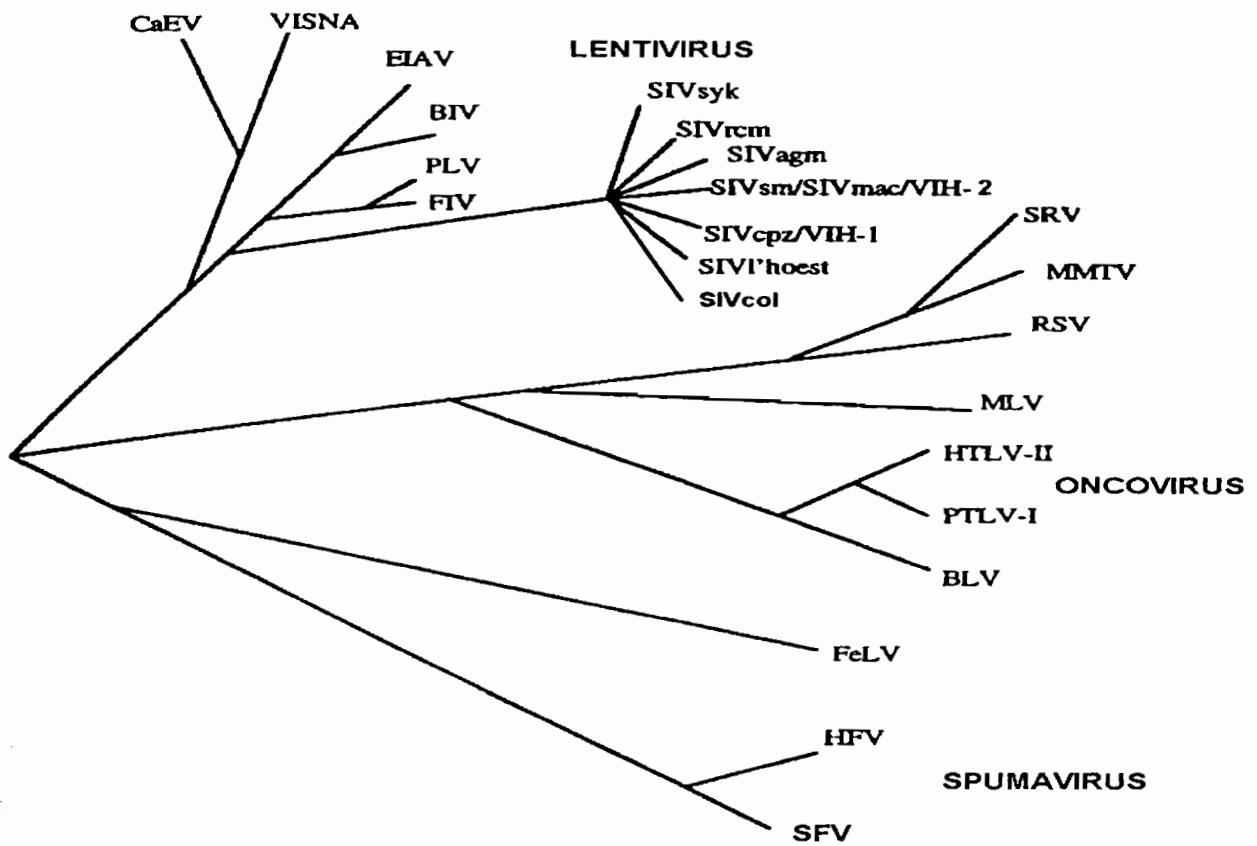
En 1985, des réactions sérologiques atypiques ont été mises en évidence avec des sérums de prostituées du Sénégal. Ces observations laissaient suspecter l'existence d'un autre virus responsable du SIDA. Ce virus était proche d'un rétrovirus simien isolé la même année chez des macaques vivants en captivité. Ce virus fut isolé en 1986 et désigné LAV-2 par les équipes françaises et HTLV-IV, par les équipes nord-américaines (3).

Au centre de Primatologie de Davis, Californie, des nombreux macaques ont aussi présenté des symptômes similaires au SIDA humain. Le virus responsable de ce syndrome était similaire au VIH-2 (4; 5) et, comme on l'a démontré par la suite, il provenait du transfert interspécifique accidentel du virus de mangabé (6; 7).

En 1986, une révision taxonomique harmonisa les différentes dénominations et définit les VIH (*Virus de l'immunodéficience humaine*) de type 1 et de type 2 comme agents responsables du SIDA. Le correspondant simien a été nommé SIV (*Simian immunodeficiency virus*), par analogie aux VIHs. Dans le cas des différentes espèces de primates, le nom SIV est suivi par les initiales de l'espèce. Ainsi, par exemple, le virus isolé chez les mandrills est appelé SIVmnd.

## 2. Rappel taxonomique

Il existe une ancienne classification des rétrovirus en trois sous-familles (*Oncovirinae*, *Lentivirinae*, *Spumavirinae*) (Figure 1).



**Figure 1:** Schéma des relations phylogénétique entre les représentants des trois sous-familles de rétrovirus



Cependant cette dernière n'est plus utilisée de nos jours, cette famille étant maintenant divisée en 7 genres ;

- 1- les rétrovirus des mammifères de type B comme par exemple le MMTV
  - 2- les rétrovirus des mammifères de type C comme par exemple le SSV
  - 3- les rétrovirus aviaires de type C comme par exemple le RSV
  - 4- les rétrovirus de type D comme par exemple le MPMV
  - 5- les virus BLV-HTLV comme par exemple le STLV
  - 6- les lentivirus comme par exemple les virus VIH/SIV
  - 7- spumavirus comme le SFV
- dont 3 contiennent des virus des primates (4, 6 et 7).

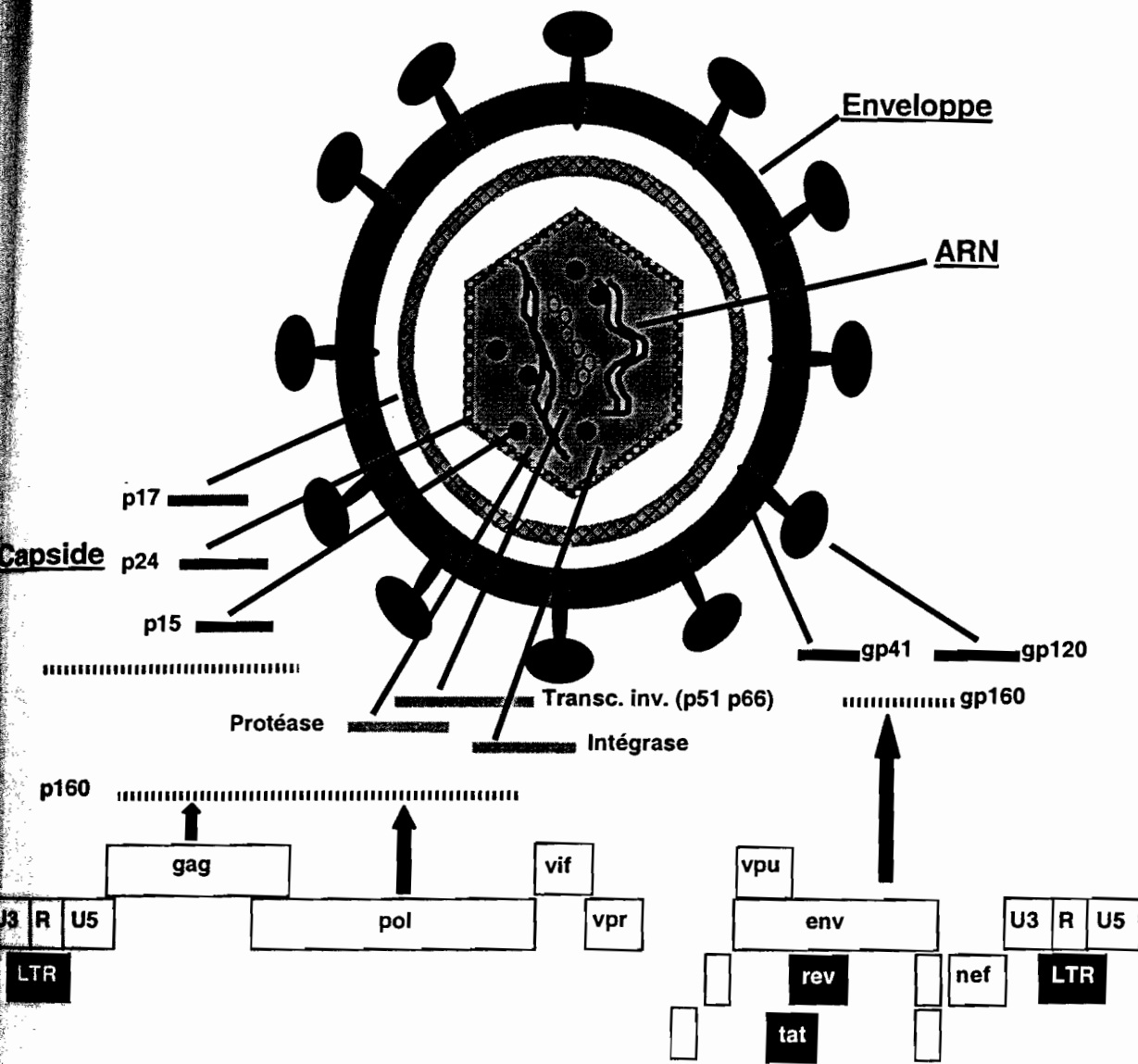
### 3. Structure et organisation génomique des Lentivirus

Les rétrovirus sont des virus ARN à polarité positive. Le génome est monopartite et comprend 7000-11.000 nucléotides. La portion 5' terminale est méthylée. La portion 3' terminale contient un fragment polyadenilé.

Les virions des rétrovirus (Figure 2) qui contiennent deux copies du génome ARN sont enveloppés, sphériques, ayant un diamètre de 80-100 nm. Sur la surface des enveloppes, on trouve des spicules de glycoprotéines (8 nm) uniformément répartis sur toute la surface du virion. La capsid est isométrique (sphérique) ou tronculaire. Les nucléides de la capsid sont symétriques ou asymétriques.

Pour les VIH, la nomenclature permet de distinguer deux types d'après leurs différences dans l'organisation génétique et la séquence de leurs protéines constitutives (8). Parmi les SIV, la nomenclature actuelle est basée sur les espèces dans lesquelles chaque virus a été isolé, par exemple pour le virus des mandrills : SIVmnd.

Les SIV appartiennent, tout comme l'agent responsable du SIDA chez l'homme, au genre *Lentivirus*. A l'instar du VIH, le SIV se distingue des autres rétrovirus par une organisation génomique particulièrement complexe. Ainsi, son génome comporte, en dehors des trois gènes constitutifs *gag*, *pol* et *env* et des éléments de régulation aux extrémités du génome (LTR-*long terminal repeats*), des gènes accessoires (Figures 2 et 3). Ces gènes, situés dans la région centrale et à l'extrémité 3' du génome codent pour des protéines de régulation de la réplication virale.



**Figure 2: Structure des virus de l'immunodéficience humaine et simienne**

Tous les lentivirus de primates (VIH/SIV) possèdent les cinq gènes de régulation *vif*, *rev*, *tat*, *vpr* et *nef*, tandis que la présence des gènes de régulation *vpu* ou *vpx* varie en fonction du virus. Trois types d'organisation génomique sont ainsi observés :

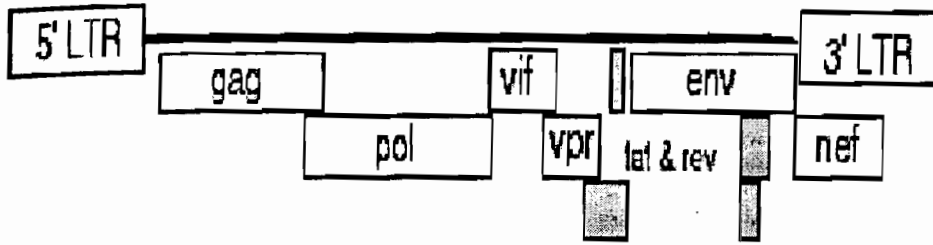
- Le VIH-1 et le SIVcpz possèdent une organisation génomique commune. Ils sont les seuls à posséder le gène *vpu* (9; 10). Récemment, la présence d'un *vpu* a été rapporté chez les SIV des singes *mona* et *wolfi* (11; 12).

- Les SIVsm, SIVmac et VIH-2 constituent un autre type caractérisé par la présence du gène *vpx* (5; 8; 13). Des études très récentes ont montré que le gène *vpx* est aussi présent dans les génomes de SIVrcm (14) et SIVmnd-2 (15) et SIVdrill (16).
- Les génomes de SIVmnd-1, SIVsyk, SIVlhoest, SIVsun et SIVcol se distinguent par l'absence des gènes *vpu* et *vpx* (17; 18). Les SIVagm sont aujourd'hui inclus dans cette catégorie. Leur génome avait d'abord été décrit comme unique dans le sens qu'il comporte le gène *vpx*, et non pas *vpr* ou *vpu* (19). Cependant, étant donné le degré d'homologie entre *vpx* et *vpr*, il a été proposé de renommer le gène *vpx* du SIVagm en *vpr* (20). Le *vpr* est considéré aujourd'hui comme étant l'ancêtre du *vpx*, ce dernier ayant probablement évolué par duplication du gène *vpr* (20).
- L'organisation complète des génomes de SIVtal, des SIV des singes mona et Brazza ne sont pas encore connus à l'heure actuelle. Il est intéressant de noter qu'en règle générale, on retrouve un même type d'organisation génomique pour les SIV présents chez des espèces appartenant à un même genre. La situation est différente pour le VIH avec deux types de virus (VIH-1 et VIH-2), apparentés pour le premier au SIVcpz et pour le second au SIVsm. Une situation similaire a été récemment observée chez les mandrills pour lesquels on a aussi démontré l'infection par deux virus différents, nommés par analogie avec les VIH, SIVmnd-1 et SIVmnd-2 (15). Ces deux virus sont aussi différents en ce qui concerne la structure génomique, le SIVmnd-1 possédant un gène *vpr* et le SIVmnd-2 un gène *vpr* et *vpx*.

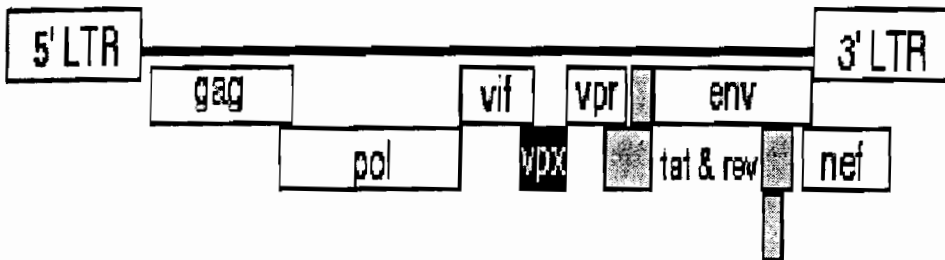
Aucun des virus présents chez les cercopithèques ou les singes verts n'a été identifié,

tout au moins jusqu'à présent, chez l'homme.

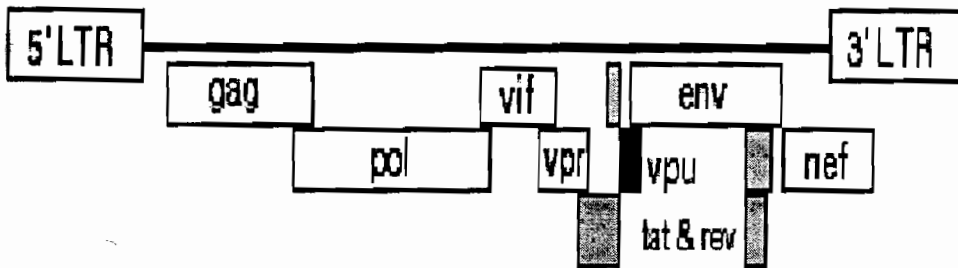
**SIV<sub>agm</sub>, SIV<sub>syk</sub>, SIV<sub>mnd-1</sub>, SIV<sub>hoest</sub>, SIV<sub>sun</sub>, SIV<sub>col</sub>**



**SIV<sub>sm</sub>, SIV<sub>mac</sub>, HIV-2, SIV<sub>mnd-2</sub>, SIV<sub>rcm</sub>, SIV<sub>drl</sub>**



**HIV-1, SIV<sub>cpz</sub>, SIV<sub>mona</sub>, SIV<sub>wol</sub>**



**Figure 3: Organisation génomique des lignées de lentivirus de primates**

## II. Les mécanismes moléculaires générateurs de la diversité et les méthodes d'études

### 1. Mécanismes de variabilité des lentivirus simiens

La variabilité génétique des rétrovirus représente le résultat de l'interaction de plusieurs facteurs, dont la fréquence de mutation, de la charge virale, du nombre de cycles viraux, les recombinaisons, les contraintes fonctionnelles et les pressions de sélection exercées par le système immunitaire.

#### 1.1. La faible fidélité de la RT et la forte réplication virale

La fréquence élevée de mutations est principalement due à deux caractéristiques fondamentales de la transcriptase inverse (21): la haute fréquence des erreurs lors de la synthèse du brin d'ADN, complémentaire au génome viral, déterminée par le manque de systèmes capables de corriger ces erreurs, car la reverse transcriptase est privée d'une activité correction-lecture d'épreuve. La deuxième cause d'erreurs est due à la capacité de la reverse transcriptase à transférer son activité d'un brin à un autre lors de la synthèse de ce brin complémentaire (22).

Différents types de modifications sont ainsi introduits comme des substitutions, des délétions, des insertions, des délétions ou des recombinaisons. Les **substitutions** résultent d'une incorporation erronée d'un nucléotide. A l'intérieur d'un codon, une mutation ponctuelle peut être synonyme, ou non synonyme. Le caractère dégénéré du code génétique entraîne plus de 70% des substitutions synonymes. La fréquence d'apparition de substitutions synonymes et non synonymes par nucléotide et par cycle de réplication rétrovirale varie entre  $10^{-4}$  et  $5.10^{-6}$  pour les rétrovirus (23; 24).

Un phénomène d'hypermutation est occasionnellement observé. C'est le cas, par exemple, du virus nécrotique de la râte (SNV) (25) et des lentivirus (26; 27) pour lesquels a été décrite une incorporation préférentielle de nucléotides déoxyadénosines à la place de déoxyguanosines.

## 1.2. Recombinaisons

Outre les substitutions, des **insertions** et des **délétions** d'un ou plusieurs nucléotides sont observés. Elles s'expliquent par des phénomènes de recombinaison homologue entre deux régions de séquences similaires au sein d'un même brin (25).

Les phénomènes de **recombinaison homologue** entre deux brins différents d'ARN ont été également décrits. Ces phénomènes se produisent probablement lors de la rétro-transcription, au moment où la transcriptase inverse saute d'une matrice à l'autre pendant la synthèse d'ADN. Ces recombinaisons peuvent se produire entre deux molécules d'ARN d'un même virus, mais aussi entre les ARN de deux virus apparentés présents au sein d'une même cellule ou encore entre les séquences d'un virus exogène et endogène à l'intérieur d'une même cellule. La fréquence de ce phénomène de recombinaison a été estimée à 0,4 par cycle répliatif pour le SNV *in vitro* (28).

Les phénomènes de **recombinaisons non-homologue** sont beaucoup plus rares. Il s'agit de réarrangements entre deux séquences non-apparentées. Ce phénomène est le principal mécanisme à l'origine de l'insertion d'oncogènes dans des génomes rétroviraux (29).

La recombinaison est un élément contribuant à l'élargissement de la diversité des VIH. Cet événement pourrait être considéré comme sporadique, limité aux régions présentant de multiples sous-types et sans conséquence majeure dans la dynamique VIH. D'autres démontrent au contraire que la recombinaison peut être à l'origine de nouveaux virus, responsables d'épidémies importantes dans certaines régions ces virus sont regroupés sous la désignation de forme recombinante circulante (CRFs).

## 1.3. Pressions de sélection et quasi-espèces

Tous les mutants sont soumis aux pressions de sélection du système immunitaire. Les virus adoptent différentes stratégies pour contourner ces pressions (30). Une variation continue des protéines permet aux virus d'échapper aux réponses immunitaires de l'hôte. C'est apparemment le cas des glycoprotéines de surface des lentivirus de primates. En effet, la fréquence des mutations non synonymes est plus importante au niveau du gène *env* du VIH-1 par rapport aux autres gènes de structure, ce qui indique une pression de sélection positive pour le changement (31; 32)

Pour échapper aux défenses du système immunitaire, tous les rétrovirus utilisent plus ou moins intensément la stratégie consistant à se rendre invisible en restant sous la forme de virus latent. Les virus, dont l'adaptation à l'hôte est ancienne, tendent à se rendre invisible par une réduction de l'antigénicité des protéines virales. Celle-ci peut être réalisée, par exemple, par une perturbation de la présentation d'antigènes ou par une ressemblance à une protéine de l'hôte. Le VIH-1 semble mettre en œuvre ces stratégies (33-35). Les variants ayant une immunogénicité réduite possèdent un avantage sélectif dans le sens qu'ils peuvent persister plus facilement dans l'organisme.

Les pressions de sélection, qu'elles soient fonctionnelles ou immunitaires varient donc en fonction de l'hôte et du virus. Les taux de fixation des mutations au cours du temps ne sont pas uniformes. C'est la raison pour laquelle il est extrêmement difficile d'estimer le moment où les virus ont commencé à diverger. Cependant, l'origine du VIH-1 a été estimée par des analyses moléculaires et elle remonterait entre 1910 et 1930 (36), tandis que la divergence entre le VIH-1 et le SIVcpz a été estimée avoir eu lieu au 17<sup>ème</sup> siècle (36).

La chronicité de l'infection à VIH, met en exergue un mécanisme, se traduisant par un « turnover » élevé du VIH et des lymphocytes. Ce mécanisme s'appuie sur (i) une production virale journalière de  $10^9$  à  $10^{12}$  virions dont la demi-vie est de 6 heures, (ii) une activation journalière de deux cent millions de lymphocytes dont la demi-vie est de 1,5 jours, et (iii) le fait que le virus tue deux cent millions de T4 par jour entraîne avec le temps un épuisement des réserves de T4 de l'organisme et aboutit à un SIDA. C'est l'une des théories modernes de la pathogénèse du SIDA (37)

## 2. Méthodes d'étude de la diversité

### 2.1 Sérotype

De nombreuses techniques de sérotypage ont été mises en oeuvre (38-40). En général, elles permettent une première approche méthodologique. Dans le cas de larges enquêtes, c'est clairement la technique la plus facile à mettre en oeuvre. Si elle peut, dans certains pays, être utilisable (39; 41-43), dans d'autres cas, principalement dans les pays d'Afrique, les résultats peuvent s'avérer difficiles à interpréter. La méthode mise au point par Barin *et al.*, utilisant des peptides de la boucle V3 de l'enveloppe dans un système de compétition en phase liquide, donne les meilleurs résultats (40). Récemment une technique plus sensible a été mise au point, basée toujours sur l'utilisation de peptides synthétiques représentant les séquences consensus

V3 et gp41/36 des 4 lignées de lentivirus humains et simiens (44). Ce système EIA (*Enzyme immuno-assay*), a permis de détecter les anticorps dirigés contre la boucle V3 et la gp41 des échantillons simiens et humains (44).

## 2.2 Génotype

Plusieurs techniques permettent d'évaluer la diversité génétique des rétrovirus. Parmi celles-ci nous avons ;

**Migration des hétéroduplexes d'ADN (HMA) :** le principe du HMA (45) est la dénaturation suivie de la renaturation entre un brin d'ADN et son brin complémentaire (formation d'homoduplex) ou entre deux brins qui ne sont que partiellement complémentaires (formation d'hétéroduplex). Les mauvais appariements des nucléotides entraînent une mobilité électrophorétique réduite révélées sous UV, après coloration d'un gel de migration par le bromure d'éthidium. Cette technique a été adaptée pour les souches SIV<sub>sm</sub> et SIV<sub>agm</sub> (46; 47).

**Séquence nucléotidique :** l'analyse des séquences nucléotidiques reste la technique de référence et permet les comparaisons inter-séquences. L'ADN proviral ou l'ADNc provenant de l'ARN reverse-transcrit peuvent être utilisés. La séquence peut être déterminée soit après clonage, soit directement sur les produits d'amplification de PCR. Les avantages du séquençage après PCR sans clonage résident sur sa rapidité et son moindre coût ; les inconvénients sont représentés par les risques d'erreurs lors de l'amplification de l'ADN par l'enzyme Taq-DNA, car elle n'est pas pourvue de fonction correctrice. De nombreux systèmes utilisant des enzymes ayant des activités correctrices ont été développés pour cette application.

**Calcul des distances génétiques :** La distance génétique est représenté par le nombre de mutations fixées au cours de l'évolution entre deux séquences, rapportée au nombre de sites des séquences. Pour une paire de séquences alignées, le nombre de substitutions observé est supérieur au nombre de différences générés par des substitutions multiples, parallèles ou inverses et non fixées. La **transition** est la mutation entre deux bases puriques ou deux bases pyrimidiques. La **transversion** est la mutation d'une base purique qui est substituée par une base pyrimidique ou inversement. On estime la distance évolutive vraie par différents moyens



statistiques et mathématiques. La méthode de calcul de **Kimura** à deux paramètres, part de l'hypothèse préalable que les sites de deux séquences évoluent à la même vitesse, et que les substitutions se produisent selon deux fréquences, l'une pour les transitions, l'autre pour les transversions. Elle permet de calculer la distance évolutive à partir des fréquences observées de transition et de transversion entre deux séquences.

**Phylogénie** : Il existe plusieurs algorithmes qui permettent d'estimer les relations phylogénétiques entre les isolats, en particulier ceux réunis dans le logiciel **PHYLIP** (*Phylogeny Inference Program*) de J. Felsenstein (48).

La technique la plus employée est la "**méthode du plus proche voisin**" (*Neighbor-Joining*). Cette méthode, très rapide, utilisant une matrice de distance permet de retrouver de manière efficace un arbre correct en comparant les séquences par paires.

Les méthodes de **parcimonie**, beaucoup plus lentes, examinent tous les caractères et ne conservent que les sites informatifs pour déterminer l'arbre dont la longueur totale sera la plus courte. Cette méthode peut, dans le cas des VIH ou d'autres virus très variables, être mise en défaut. Une alternative est la méthode du "**maximum de vraisemblance**" (*maximum likelihood*) qui procure une estimation de la probabilité associée à chaque embranchement et à la distance entre deux nœuds. Cette méthode, qui associe aussi tous les nucléotides, est très lente, et ne peut être utilisée que pour l'analyse des nucléotides.

Dans tous les cas, l'analyse phylogénétique des séquences du VIH est fortement influencée par l'**homoplasie** (identité liée au hasard). Contrairement à l'**homologie**, l'homoplasie est une similitude qui n'est pas héritée d'un ancêtre commun. Il est donc important de faire la distinction entre l'homologie qui est le résultat d'une convergence évolutive, et donc *a priori* relève d'une fonction, et la similitude qui définit juste la ressemblance.

Une limite aux études phylogénétiques est la nécessité d'aligner parfaitement les séquences : il faut donc introduire des délétions ('*gap*') afin d'aligner les séquences à comparer. Un certain nombre de programmes n'interprétant pas correctement ces '*gap*' dans le calcul, il y a nécessité d'éliminer les portions d'alignement contenant ceux-ci ou *gapstripping*. Ce *gapstripping* peut conduire à supprimer parfois de nombreux sites informatifs.

**Le Bootstrap** : Il s'agit d'une méthode générale statistique permettant d'estimer la précision des branchements par ré-échantillonnage des données. Le plus souvent, on procède à 100 ré-échantillonnages. La valeur de bootstrap indique le pourcentage de branchements

identiques à une position donnée d'un arbre. En pratique, elle indique la probabilité de la réalité d'un branchement entre différentes souches. Seuls les branchements ayant au moins 60% de bootstrap peuvent être considérés comme probables.

**Mutations synonymes/non synonymes :** Une autre façon d'analyser les séquences est d'exploiter les différences entre mutations **synonymes (MS)**, et **non synonymes (MNS)** (49; 50). Une MS (conservation de l'acide aminé) est en général considérée comme une position qui n'est pas soumise à une pression de sélection. Une MNS (changement de l'acide aminé) peut avoir un effet immédiat positif (résistance aux antiviraux, échappement à la réponse immune) ou négatif (mutation létale). En général, le code génétique est tel que la majorité des mutations fixées sont non-synonymes. L'étude des distances pour l'analyse phylogénétique basée sur les MNS permet en général d'exclure l'homoplasie (51; 52). Il existe un taux de MS relativement uniforme au sein des rétrovirus des primates. La comparaison des fréquences des MS et MNS (53) permet de mieux évaluer la variabilité VIH en complément des analyses phylogénétiques classiques.

La comparaison de deux séquences permet de calculer le nombre théorique de MS potentielles pour chacune de ces séquences. Le rapport  $P_s$  indique pour une séquence le nombre de MS observées sur les nombre de MS potentielles. Le rapport  $P_n$  est calculé de façon identique pour les MNS observées sur le nombre de MNS potentielles (50). Le calcul est accessible à travers le logiciel MEGA, SNAP (<http://www.VIH-lanl.gov>).

### **3. Conséquences de la diversité des lentivirus simiens**

#### **3.1. Répercussions sur le diagnostique**

##### **3.1.1 Répercussions sur le diagnostique sérologique**

La grande diversité des lentivirus peut avoir des conséquences pour le diagnostique sérologique des infections à SIV/VIH. Ainsi pour les diagnostique des VIH, on constate que les VIH-1 groupe O ne sont pas détectés par les tests commerciaux, spécialement ceux utilisant des peptides synthétiques (54; 55).

D'autres études ont démontré que les problèmes de dépistage peuvent persister même en utilisant des peptides O spécifiques, à cause de la grande diversité de ces virus (56). Ainsi

les défauts de reconnaissance des VIH-O des trousse commerciales ont été utilisés dans les algorithmes de dépistages de ces variants (57).

Par ailleurs, il y a un manque de sensibilité des trousse dans la détection des séroconversions précoces pour les sous types VIH-1 non B du groupe M (58). Dans le cas des infections VIH-2, il a été démontré la non-détection d'une souche de sous type B par les trousse commerciales (59). Il a été constaté que des réactions croisées des VIH-2 sous type B sont plus forte sur les western blot VIH-1, ce qui donne de faux doubles positifs (59).

Ces aspects soulignent la nécessité d'utiliser des antigènes spécifiques pour un grand nombre de virus à tester, tels les peptides O qui donnent une bonne performance (57; 60) ou des peptides pour différentes lignées SIV donnant d'excellentes performances (44). L'utilisation des peptides correspondant aux glycoprotéines d'enveloppe du SIV comme source d'antigène, des épitopes immunogénétiques tel que pour SIVmac (61; 62), SIVagm (63; 64), SIVsm (61), (62), (65), SIVmne (66) ont été identifiés et représentent l'approche sérologique la plus fine pour l'identification des lentivirus des primates

En ce qui concerne le diagnostic sérologique direct de l'infection par SIV, il y a aussi des problèmes de détection de l'antigène tant pour la phase aiguë que pour la phase tardive de l'infection. La détection de l'antigène p24, par immunocapture donne de faux négatifs (67). L'utilisation de l'antigène p27 monoclonal du SIVmac251 ou de l'antigène p24 polyclonal de la trousse (Elavia, Pasteur) sont utiles afin de détecter les infections SIV de plusieurs espèces de primates tel que SIVagm (68). Seulement ces réactions croisées ne permettent pas de quantifier avec exactitude le taux d'antigène à cause des différences de réactivités. La plupart des trousse commerciales, utilisant comme test d'antigène capture-VIH-1, sont capables de détecter SIV (68-70). Ces tests commerciaux utilisent comme sources d'antigènes VIH (VIH-1 sous type B, VIH-2 ROD et VIH-O Ant 70), et donnent souvent de faux négatifs. L'emploi d'anticorps monoclonaux générés contre les antigènes de SIV, est plus sensible (71-74).

### **3.1.2 Répercussions sur le diagnostic virologique**

Dans le système d'antigène capture le choix de l'anticorps utilisé détermine la spécificité du test. En utilisant des anticorps avec un large spectre on peut détecter simultanément VIH-1, VIH-2 et SIV (75), des anticorps plus spécifiques peuvent être utilisés pour distinguer les différentes souches de SIV (76-80). Les sérums des singes infectés avec SIV peuvent contenir des taux d'anticorps anti-*gag* qui interfèrent avec la détection d'antigène

par la méthode ELISA et cela donne des résultats faux positifs (81). Une procédure de lavage a été proposée pour éliminer ces anticorps (82).

D'autres méthodes plus sensibles, basées sur la mesure de l'activité de la transcriptase inverse (protéines moins variables) ont été testées. Elles étaient isotopiques au départ et permettaient de surveiller la multiplication du VIH-1, VIH-2 et SIV (83; 84) dans les milieux de culture cellulaires ou de particules ultracentrifugées. Par la suite, elles ont été remplacées par des méthodes non isotopiques (85; 86), pouvant mesurer l'activité de la RT dans le plasma chez les personnes infectées par le VIH-1 et des macaques infectés par le SIVmac au début de l'infection virale (87). L'avantage considérable d'utiliser un test commun pour mesurer l'activité de la RT, réside sur la possibilité de détecter la RT des différents lentivirus, alors que les épreuves basées sur la détection des antigènes sont dépendantes du virus et même parfois du genre (la détection de l'antigène p24 est spécifique pour le VIH-1).

Les autres méthodes permettent d'isoler et de quantifier SIV par infection des cellules et mesure de la TCID<sub>50</sub> (*Tissue cell infected dose*) (88), mais sont tributaires de deux facteurs : la souche et le tropisme cellulaire vis à vis de la souche étudiée. Devant la grande diversité des SIV et la difficulté de mettre en place des techniques sensibles pour tous les lentivirus, la PCR (*Polymerase chain reaction*) reste la seule méthode facile et sensible, à condition de connaître le virus. Cette méthode permet non seulement de détecter les SIV connus (89; 90), mais aussi les rétrovirus non caractérisés (91). Par cette technique l'on peut aussi détecter les générations de mutants (47; 92), quantifier les SIV dans les PBMC et le plasma (68; 93).

### **3.2. Impact sur la sensibilité aux antirétroviraux**

Deux classes principales de médicaments anti-rétroviraux ont été décrits jusqu'à présent : les inhibiteurs de la reverse transcriptase et les inhibiteurs de la protéase (94). Tous les inhibiteurs de la transcriptase inverse bloquent rapidement l'infection VIH-1 en inhibant la transcriptase inverse du VIH-1. La plupart de ces médicaments bloquent rapidement la réplication virale *in vitro*, cependant les bénéfices à long terme de ces médicaments sur la progression clinique de la maladie sont incertains (95). Les souches VIH-2 et la plupart des VIH-1 du groupe O sont résistants aux inhibiteurs non nucléosiques de la transcriptase inverse (96). Après une thérapie prolongée, des virus résistants aux médicaments émergent à cause d'un point de mutations dans le gène de la polymérase ce qui aboutit à un changement d'acide aminé (26; 97; 98). Une résistance naturelle de certaines souches VIH-1 du groupe M (au sein des sous-types A, F et G) aux inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase et aux

inhibiteurs de protéase a été mise en évidence (43; 99). Les VIH du groupe O sont sensibles en général aux inhibiteurs nucléosidiques mais sont le plus souvent naturellement résistants aux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (96). Les souches SIVcpzGab1 et SIVcpzAnt présentent les mêmes phénotypes de sensibilité aux inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques que les souches VIH-1 du groupe M (100).

L'AZT a donné des succès limités chez les modèles macaques /SIVmac et SIVmne à cause de la faible charge virale, mais aussi par le niveau relatif d'inefficacité enregistré contre VIH-1 ou SIV (101; 102).

D'autres molécules ont été testées chez les macaques infectés par différentes souches de SIVmac ou VIH2 (101-108) et ont montré des niveau d'efficacité variable en fonction du virus, de l'hôte et du produit.

Les virus chimériques nommés RT-SHIV se sont montrés sensibles aux effets inhibiteurs des nucléosiques et non nucléosiques. Par contre, le SIV est inhibé seulement par les inhibiteurs nucléosiques (3TC et AZT), mais pas par les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse. On note l'apparition de mutants lorsque le RT-SHIV est cultivé en présence de 3TC, nevirapine, TSAO-m3T ou le UC-42 (109). Le spectre de sensibilité et de résistance des souches mutantes contre les inhibiteurs nucléosiques et non-nucléosidiques et la nature apparente des mutations dans leur RT, sont similaires à ceux des souches VIH-1 qui ont été sélectionnées des conditions expérimentales identiques (109).

### **3.3. Influence sur l'utilisation des co-récepteurs**

Le changement de l'utilisation des co-récepteurs lié à la diversité des lentivirus induit une modification des types de cellules cibles de l'infection. Il a été démontré clairement que les SIV et le VIH-1 sont des virus à tropisme macrophagique utilisant le CCR5 comme co-récepteur pour entrer dans les cellules humaines (110-116) et que le CXCR4 est le principal co-récepteur des souches VIH-1 et VIH-2 sur les lignées T tropique (117; 118). Certaines souches à tropisme macrophagique n'utilisent pas seulement le CCR5, mais aussi le CCR2b et CCR3 (111). Par ailleurs, il y a des isolats VIH-1 qui utilisent le CCR2b, CCR3 et le CCR5 aussi bien que le CXCR4 (111), CCR8 (119-121), CCR9 (122), CX<sub>3</sub>CR1 (121; 123), APJ (122; 124), BLTR (125) et Chem R23 (126). D'autres travaux (115; 127; 128) ont montré une utilisation différentielle du CCR5 par des isolats SIV et VIH à tropisme macrophagique et du CXCR4 par différent isolats viraux T-tropique. En plus, plusieurs isolats M et T-tropique VIH

et SIV sont capables d'utiliser des récepteur comme Bonzo ou STRL33 (129-132), BOB ou gp15 (130; 133) ou US28 (134). SIVmac et d'autres souches tel que SIVagm (130), ou SIVcpz (135) et SIVsm (136) utilisent comme corécepteur principal le CCR5 (ou d'autres co-récepteurs), le SIVrcm utiliserait le CCR2b/ STRL33 (137) et le SIVdrl le CCR5 et STRL33 (16). Le SIVmnd-1 et SIVrcm utilisent respectivement le CXCR4 (138) et le CCR2b (137). Récemment, un nouveau co-récepteur RDC1, utilisé par VIH-1, VIH-2 et des souches SIV, a été découvert (139).

S'il est probable que d'autres récepteurs restent à découvrir, il faut cependant noter que tous les récepteurs de chimiokines ne sont pas *de facto* des co-récepteurs des VIH/SIV, comme cela a été montré pour CCR1, CCR4, CCR6 et les récepteurs CXC autres que le CXCR4. Il semblerait que la glycoprotéine d'enveloppe impliquée dans la fusion puisse interagir avec une séquence commune à une large variété de co-récepteurs. En effet, certaines souches R5 de VIH1 utilisent non seulement le CCR5, mais également CCR2b et CCR3 (111; 140). L'utilisation des co-récepteurs par certains virus peut être large comme le montre la souche VIH-1 89.6 (R5X4) qui peut utiliser au moins sept co-récepteurs (CCR5, CXCR4, CCR3, CCR2b, CCR8, CX<sub>3</sub>CR1 et Bonzo) pour entrer dans la cellule (113; 121; 131; 141). L'utilisation de ces co-récepteurs peut se faire indépendamment du CD4 (142; 143), et pourrait expliquer l'infection par le VIH de cellules n'exprimant pas le CD4 comme les fibroblastes (144-146) les cellules épithéliales (143; 147) et les cellules endothéliales (148; 149). Certains isolats SIV ont aussi la capacité d'infecter des cellules indépendamment du CD4 (150; 151).

### 3.4. Effets sur la transmissibilité

La prévalence est variable selon la souche SIV. Chez le mandrill, elle est de 12,5 % et demeure plus basse que celle observée dans une colonie de mangabé (57% pour SIVsmm) (152) ou chez les espèces *Cercopithecus* à l'état sauvage ou en colonie (26-42%), où la prévalence dans l'infection SIVagm chez les vervets est de 25% (153-156).

Chez les singes verts, les macaques et les mangabés, la transmission sexuelle semble la voie majeure de transmission du SIV (157; 158). La transmission sexuelle SIV, d'une femelle macaque infectée par SIVmne à un mâle *Macaca nemestrina* a été observée (159). Les autres voies (traumatique et verticale) sont rares dans l'infection naturelle SIVagm (160). Cependant, la voie traumatique a été démontrée comme voie majeure de contamination dans un groupe de macaques (161). Les seules voies de contamination SIV observées jusqu'à ce

jour dans l'infection naturelle SIVmnd chez le mandrill sont par transmission verticale de la guenon au juvénile (70; 154) et par contamination horizontale à la suite de combat entre mâles au sein de la colonie (162).

### 3.5. Influence sur la pathogénie

Deux types d'infection lentivirale ont été décrits ; l'une pathogène, l'autre non pathogène en fonction des souches virales et des espèces hôtes.

Les études *in vitro* sur le tropisme cellulaire sur les souches isolées ont démontré que les effets pathogènes de ces virus étaient largement dépendant des récepteurs et corécepteurs utilisés par ces derniers (163). En effet, les études phénotypiques montrent que certains isolats peuvent avoir un tropisme plus large que d'autres, exemple SIVcpz-Gab1 et SIVcpz-Ant sont capables de se multiplier dans les lignées Molt 4 et CEM comme le VIH-1. Inversement, ils sont incapables d'infecter les cellules MT-4 ou HUT78, ce qui suggère l'importance du co-récepteur CCR5 (135), alors que les SIVsyk sont restreints aux cellules de l'hôte (164).

Ces souches induisent ou non le SIDA chez différents modèles d'infection. Pour les deux chimpanzés précités et naturellement infectés par SIVcpz (SIVcpz Gab-1 et SIVcpz Ant), un suivi de plus de 10 ans ne met en évidence aucune immuno-dépression. Une thrombopénie est notée chez l'animal infecté par SIVcpz-Ant (165; 166).

Par contre dans le modèle d'infection SIVmac chez le macaque, l'évolution l'infection dépend du virus inoculé et de l'animal. Ces virus correspondent soit à des souches virales isolées à partir d'animaux infectés en captivité, soit à des clones moléculaires obtenus à partir de ces isolats. Ces virus induisent ou non une maladie et lorsqu'ils l'induisent, son évolution est plus ou moins rapide selon le virus inoculé.

Les isolats SIVmac251 et SIVmac239 induisent chez les macaques rhésus une évolution rapide vers un SIDA (167; 168). Sur trois clones, issus de l'isolat SIVmac251 (SIVmac251, SIVmac1A11 & BK28), le clone (BK28) induit occasionnellement un SIDA chez ces animaux, alors que les deux autres ne sont pas pathogènes (169-171). Le clone moléculaire SIVmac239 présente les mêmes caractéristiques de pathogénicité que l'isolat d'origine (170). Contrairement aux isolats SIVmac251 et SIVmac239, l'isolat SIVmne possède un pouvoir pathogène intermédiaire chez le macaque rhésus (4).

Autre exemple : l'histoire naturelle de l'infection de *Macaca nemestrina* par les clones SIVmac BK28 dérivant d'une adaptation du SIVmac251 sur des cellules de lignées (172) et SIVmac H824, virus chimère obtenu en combinant le BK28 avec un ADN viral issu du

génomique du thymus d'un macaque infecté, a montré une différence dans la pathogénicité de ces deux virus : sur 85% des singes inoculés avec le SIVmac BK28 qui font un SIDA au bout de 2 ans, la moitié de ces mêmes animaux redeviennent asymptomatiques 7 années après l'infection, par contre les macaques à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) inoculés avec le SIVmac H824, 50% succombent à la maladie entre une et une année et demie (173).

Les transferts inter-espèces de certains virus augmentent la pathogénicité de ces derniers qui au départ n'étaient pas pathogènes chez leur hôte naturel.

Les macaques rhésus et les macaques à queue de cochon sont aisément infectables par le SIVsm (174) et développent généralement un SIDA en réponse à l'infection. Comme l'infection SIVmac, l'infection SIVsm évolue plus ou moins rapidement vers la maladie selon l'hôte et selon le virus inoculé à l'animal. Citons par exemple l'isolat SIVsmF236 qui provient d'un macaque infecté par un SIVsm originaire d'un mangabé infecté naturellement (175). L'isolat SIVsmF236 et le clone SIVsmH4 n'induisent un SIDA chez le macaque qu'après 3 ans. L'isolat SIVsmF236 a été passé successivement chez deux macaques rhésus. L'isolat SIVsmE660 en dérive et ces passages ont augmenté le pouvoir pathogène du virus. Un tiers des animaux inoculés avec l'isolat SIVsmE660 développe un SIDA en moins d'un an.

L'isolat SIVsmm9 obtenu chez un mangabé infecté naturellement n'est pas pathogène chez son hôte (176), mais provoque une immunodéficience sévère chez le macaque (177). Les mangabés développent une maladie fulgurante après inoculation de SIVsmmPBj14 (178), isolat obtenu à partir d'un des macaques infectés par SIVsmm9 et présentant des signes cliniques sévères caractéristiques du SIDA (179). Les variants de ce virus ont été clonés (SIVsmmPBj14.cl6.6, SIVsmmPBj14.cl1.9, SIVsmmPBj14.cl4.41) et se sont avérés reproduire la maladie fulgurante observée avec l'isolat (169). Les macaques présentent également un SIDA après infection par le SIVlhoest (180).

L'infection des singes verts ne semble pas pathogène (68; 181), toutefois l'infection des macaques par SIVagm a été tentée, seules des infections transitoires ont été observées, à l'exception de macaques rhésus co-infectés par le SRV-1 et de trois macaques à queue de cochon chez lesquels une infection persistante par les isolats de vervets SIVagm155 et SIVagm90 a été décrite (182; 183), l'infection a pu être reproduite avec le même hôte avec l'isolat SIVagm90, mais non avec SIVagm155 (175). La souche SIVagm9063 s'est montrée pathogène chez les macaques à queue de cochon (184) induisant un SIDA.

L'infection du Red cap mangabey par SIVrcm n'est pas pathogène in vivo (14), le passage de ce virus chez le macaque rhésus ne provoque non plus de maladie (185). Il en est



de même pour l'infection expérimentale du macaque par le SIV<sub>syk</sub> et qui est persistante mais ne provoque pas de SIDA (186).

L'influence de la diversité des lentivirus sur la pathogénie montre bien, que la pathogénèse lentivirale n'est exclusivement pas le fait de la souche étudiée, mais aussi des facteurs liés à l'hôte. En effet, malgré la forte virémie similaire à celle observée chez le modèle pathogène (VIH-1, SIV<sub>mac</sub>), l'infection naturelle et expérimentale du singe vert et du mangabé reste asymptomatique (187; 188).

### 3.6. Conséquences vaccinales

L'efficacité de la protection recherchée est fonction de la diversité virale et de la pathogénicité. Les virus étant différents au niveau de la protéine *env* (SIV, VIH) épitope dominant de l'activité neutralisante et d'autres gènes viraux, on aboutit à des réponses CTL et en anticorps neutralisants différents. Ce qui pose le problème de l'utilisation des singes comme modèles pour les tests vaccinaux.

Un vaccin efficace contre le SIDA devrait protéger contre l'épreuve de différents isolats VIH-1 provenant de différents lieux géographiques et exprimant génétiquement un éventail divers de la protéine d'enveloppe. Des observations publiées indiquent que la vaccination par les virus vivants atténués protègent contre des épreuves de virus exprimant une antigénicité non reliée aux protéines d'enveloppe. L'immunisation avec des clones du SIV<sub>mac</sub> atténués peut conférer une protection non seulement contre une super infection quand elle est provoquée avec SIV<sub>mac</sub>251 non cloné (189), mais aussi contre une épreuve intraveineuse (190; 191) et intra rectale (192) avec le chimère SHIV-4 dont les gènes *env*, *tat* et *rev* du SIV ont été remplacés par les régions équivalentes du VIH-1 (193). Les vaccinations utilisant les produits d'enveloppe recombinantes ont aussi donné une protection immunitaire contre SIV (194).

Toutefois, des vaccins SIV (avec du virus vivant) portant des mutations au niveau des gènes de régulation ont conféré une protection contre l'infection SIV<sub>mac</sub>. En effet, il a été observé en 1991 par un groupe de recherche en primatologie en Nouvelle Angleterre, une rupture irréversible dans le gène *nef* du clone pathogène SIV<sub>mac</sub>239 atténué au cours de l'infection du rhésus macaque. En dépit de la persistance du virus, un groupe de 6 macaques sont encore restés asymptomatiques 3 ans après infection avec le clone SIV<sub>mac</sub>239 $\Delta$  *nef*. A contrario, dans un groupe équivalent, les macaques infectés avec le clone parental sauvage avaient déjà tous développé des signes cliniques d'immunodéficience (168). La capacité

vaccinale a été appuyée dans une autre étude utilisant le clone C8 (195) : la protection contre une super infection a été obtenue chez des macaques infectés par le clone C8 et éprouvés par voie intraveineuse avec des cellules infectées par SIVmac aussi bien que par du virus libre (196). Des études ultérieures ont indiqué qu'un SIV mutant atténué par délétion dans *nef*, *vpr*, et le LTR, éléments en amont, sont susceptibles de donner une forme pathogénique dans certaines conditions chez les singes juvéniles et adultes (197; 198). L'immunisation par SIVmac $\Delta$  *nef* ne protège pas contre l'infection par SIVmac251 (199), mais conduit à la restriction de la diversité. La protection contre l'épreuve avec SIVmac est considérablement plus efficace que ceux obtenu en utilisant d'autres approches vaccinales SIV (200).

### **III. Evolution des SIV et lignées de lentivirus de primates**

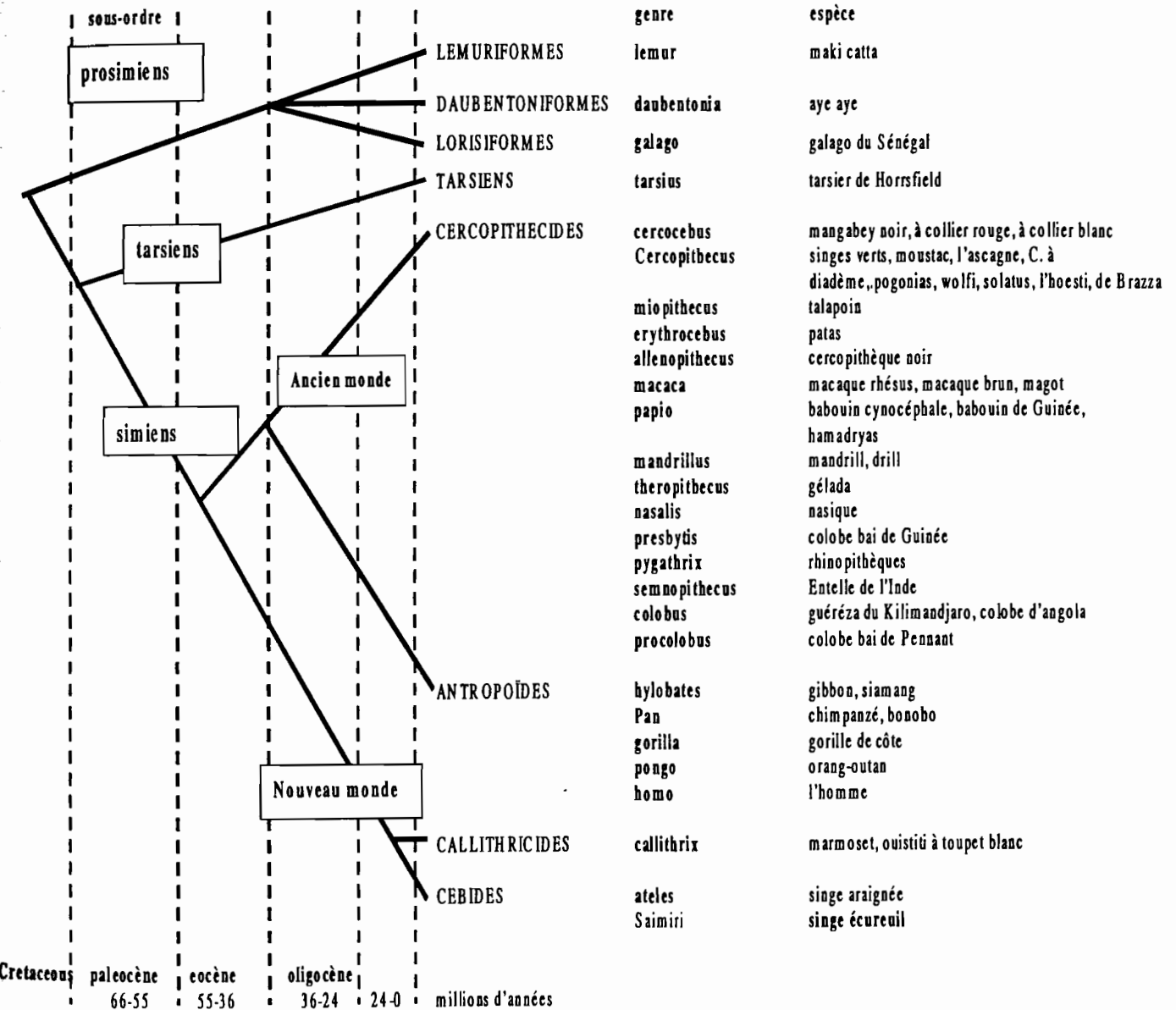
#### **1.L'évolution des primates non-humains**

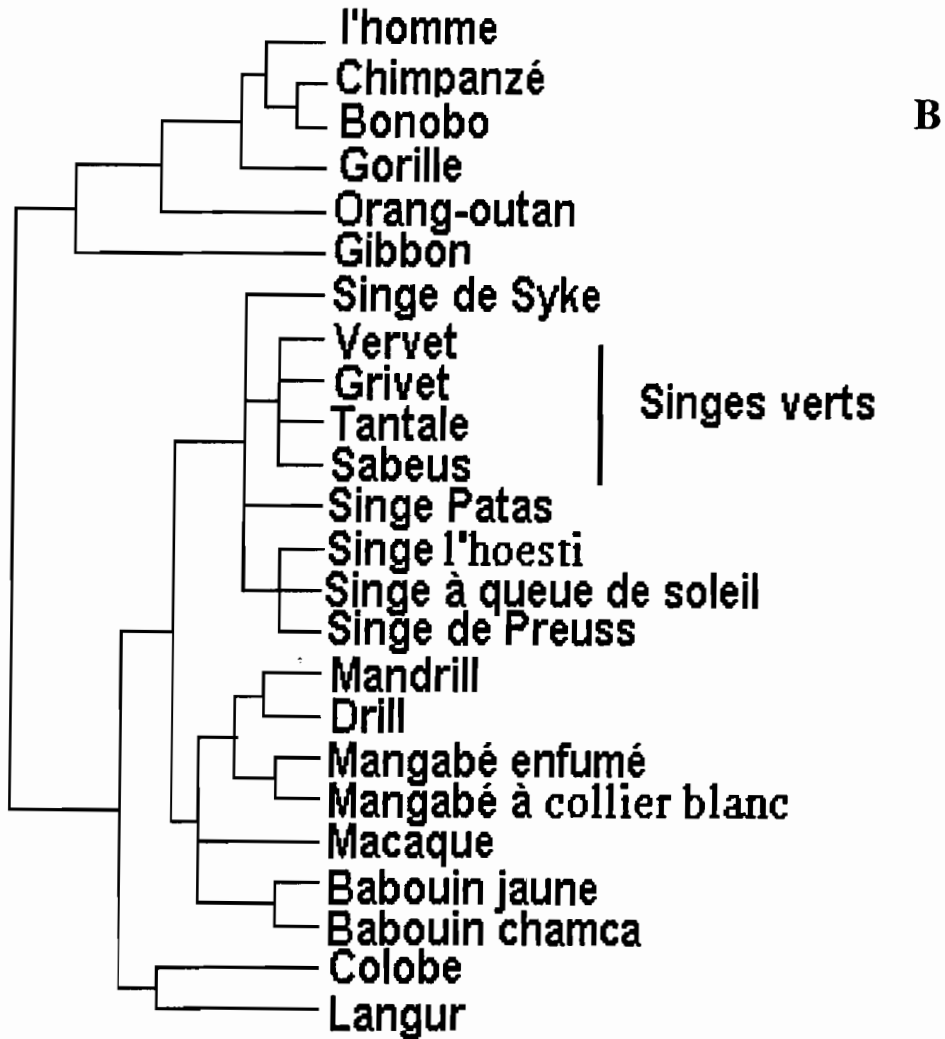
Pour mieux comprendre l'évolution des SIV, et spécialement pour pouvoir vérifier si les lentivirus des primates ont co-évolué parallèlement avec leurs hôtes pour des longues périodes de temps ou s'ils ont émergé suite a des transferts d'espèces provenant d'autres espèces des singes, il faut étudier les relations phylogénétiques établies entre les hôtes primates (Figure 4). Dans l'arbre phylogénétique des primates, les primates supérieurs, comme l'homme et les chimpanzés, sont hautement divergents par rapport aux singes de l'ancien monde, qui incluent toutes les espèces à partir desquelles on a pu isoler des lentivirus. De plus, parmi les primates de l'ancien monde, le singe de Sykes, le super groupe l'hoesti (tous les deux classés dans le genre *Cercopithecus*) et les singes verts africains (*Cercopithecus aethiops*) sont beaucoup plus proches entre eux que du groupe des mangabés (*Cercocebus sp*). Ainsi, les distances approximatives entre les 6 groupes phylogénétiques de SIV ne sont pas exactement superposées sur les différences entre leurs hôtes.

De plus, des espèces asiatiques (comme le macaque) ou africaines (comme les babouins) ne paraissent pas porteurs de leurs propres lentivirus. L'ensemble de ces observations implique que les plus anciens ancêtres des catarhiniens (les singes de l'ancien monde et les primates supérieurs) n'étaient pas infectés par des SIV il y a 25 millions d'années, mais qu'une de ces espèces a été ultérieurement infectée par un lentivirus ancestral provenant d'une source non-primate. Pendant les 20 dernières années, les lentivirus infectant différents ordres de mammifères ont été isolés (201; 202, #2841; 203; 204), mais aucun de ces

virus ne présentait de relation spécifique permettant de les associer aux lentivirus de primates. Cependant, quelle que soit l'origine des SIV, après l'adaptation et la stabilisation du virus ancestral dans une population de primates, le virus a été sujet à des transferts inter-espèces vers de nouveaux hôtes, et à une nouvelle diversification qui a conduit à l'individualisation des différents types connus aujourd'hui.

## A

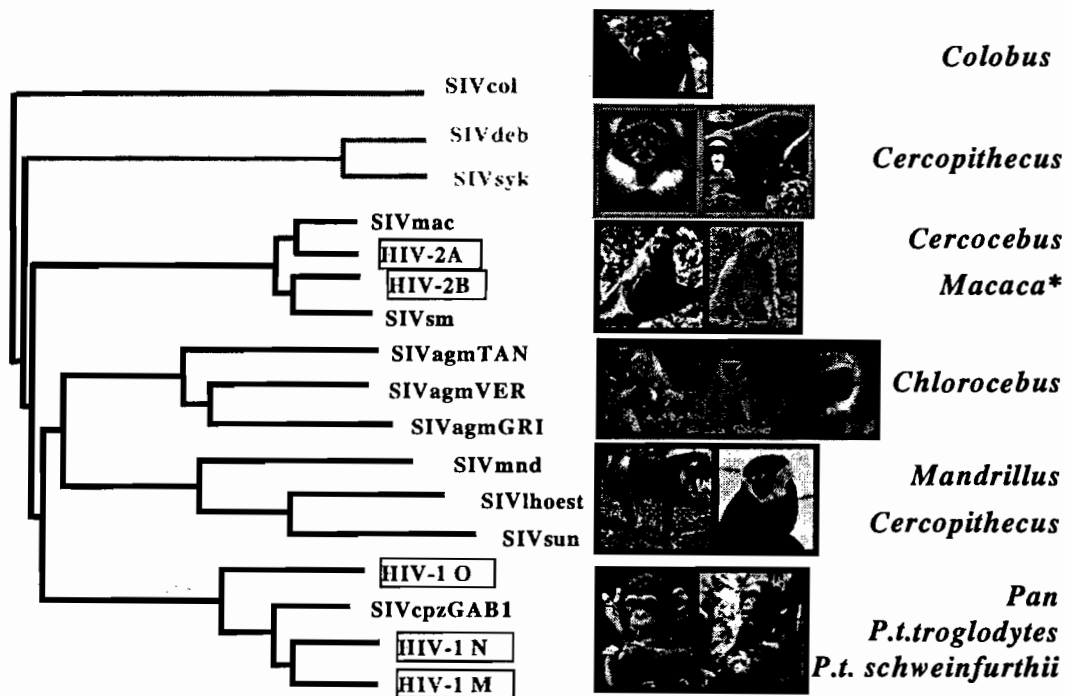




**Figure 4:** A. Ordre des primates avec quelques exemples de genres et d'espèces.  
 B. l'arbre phylogénétique des primates de l'Ancien Monde (205-208)

## 2. Relations entre les virus des primates

L'infection par SIV a été rapportée jusqu'à présent chez plus de 20 espèces différentes de primates (209). Cependant, des séquences virales complètes ne sont disponibles que pour 14 de ces virus. Dans la Figure 5 sont présentes les relations phylogénétiques



**Figure 5: Phylogénie des lentivirus de primates**

existantes entre ces virus et on peut décrire sur la base des analyses phylogénétiques six lignées différentes (210-213). Ces lignées sont représentés par:

- SIVcpz isolé des chimpanzés (*Pan troglodytes*) (9; 214-217)
- SIVsm isolé des mangabés enfumés (*Cercocebus torquatus atys*) (5; 46; 187; 218; 219)
- SIVagm qui regroupe les 4 virus isolés des quatre espèces des singes verts (récemment ré-inclues dans le Genre *Cercopithecus* dans le groupe *C. aethiops*) (19; 210; 220-227)
- SIVsyk isolé chez le singe de Sykes (*Cercopithecus mitis albogularis*) (17; 164)

- SIVlhoest, lignage formé par des virus provenant des singes qui forment le super-groupe l'hoesti (*Cercopithecus l'hoesti* et *Cercopithecus solatus*) et des mandrills (*Mandrillus sphinx*) (18; 180; 228; 229).
- SIVcol, provenant des singes du genre *Colobus* (*Colobus guereza*) (213).

Ces lignées phylogénétiques sont approximativement équidistantes, les différences dans la structure des virus contenues dans chaque lignée étant d'approximatif 40% des acides aminés des protéines pol. Quatre de ces lignées (les exceptions étant représentées par SIVsyk et SIVcol) sont formées par plusieurs souches, éventuellement provenant de plusieurs espèces ; les virus qui forment un groupe phylogénétique sont plus proches entre eux que par rapport aux virus appartenant aux autres lignées, et leur regroupement est caractérisé par des fortes valeurs de bootstrap (Figure 5, 8). L'analyse de l'arbre évolutif des lentivirus de primates a révélé qu'il n'y a pas des différences phylogénétiques évidentes entre les virus de l'homme (VIH-1 et VIH-2) et les virus apparentés des primates non-humaines (SIVcpz et SIVsm). D'un autre côté, la disposition phylogénétique des virus des primates nous démontre que du point de vue taxonomique la séparation entre VIH et SIV n'a pas de sens, puisque les deux types des virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1 et VIH-2) ne sont pas groupés dans la même lignée et donc ne sont pas des parents proches. En effet, VIH-1 est apparenté aux virus isolées chez les chimpanzés (avec lesquelles ils forment ensemble la première lignée), tandis que VIH-2 est proche des virus isolées chez les mangabés (avec lesquelles il forme la deuxième lignée) (Figure 5).

Les observations associées aux données épidémiologiques accumulées jusqu'à présent constituent la base de l'hypothèse que les virus responsables du SIDA ont émergé de l'Afrique Centrale, suite à des transferts d'espèces entre ces deux primates non-humains et la population locale (209; 230; 231).

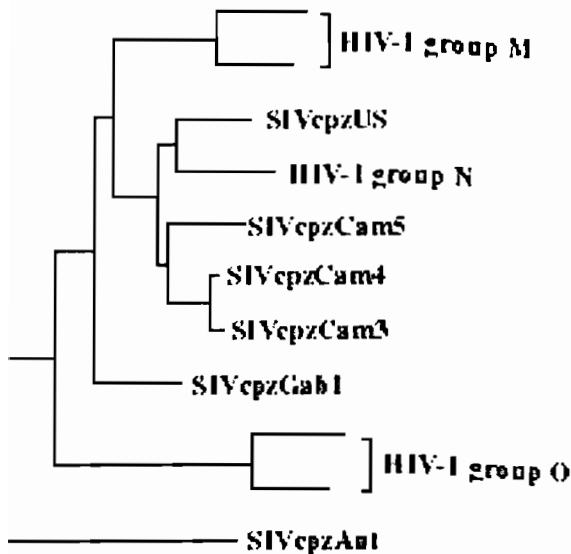
### 2.1. La lignée SIVcpz/VIH-1

Le seul lentivirus simien proche du VIH-1 a été isolé chez les chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) (Figure 5). La majorité des cas de SIDA dans le monde étant produite par le VIH-1, on dispose de beaucoup plus de séquences VIH-1 que celles des autres lentivirus des primates. Par contre, très peu de souches SIVcpz ont été isolées jusqu'à présent. Deux chimpanzés sauvages du Gabon ont été rapportés étant SIVcpz séropositifs il y a plus de dix ans (216). La séquence génomique complète a été publiée pour un de ces virus (SIVcpz-

Gab1) (9). Par contre, seul un court fragment unique de 280 pb du gène *pol* est à présent disponible pour le deuxième (SIVcpzGab-2) (215). Un troisième isolat (SIVcpzAnt) a été obtenu d'un chimpanzé (*P. t. schwenfurthii*) provenant de la République Démocratique du Congo (232; 233). Récemment, des nouveaux SIVcpz isolés ont été rapportés, un provenant d'un chimpanzé en captivité, importé d'Afrique pour les Etats Unis (214) et trois provenant des chimpanzés du Cameroun (231). En considérant des données de primatologie récentes qui sous-divisent les chimpanzés en 4 sous-espèces (234; 235), l'ADN mitochondrial de tous ces animaux a été analysé rétrospectivement. Par cette analyse, il a été établi que les deux chimpanzés du Gabon et ceux du Cameroun appartiennent à l'espèce dominante en Afrique Centrale (*Pan troglodytes troglodytes*), tandis que le chimpanzé du Congo appartenait à l'espèce caractéristique de l'Afrique de l'Est (*P. t. schwenfurthii*) (214). Le chimpanzé des Etats Unies était un *P. t. troglodytes*. Enfin, le dernier des chimpanzés du Cameroun appartenait à l'espèce nigérienne *P. t. velorossus*.

Cette caractérisation des sous-espèces présente un grand intérêt pour l'interprétation des relations phylogénétiques entre les différentes souches SIVcpz et aussi des relations entre SIVcpz et VIH-1 (Figure 6).

Ainsi, la première souche SIVcpz caractérisée en ordre chronologique (SIVcpzAnt) a été démontrée hautement divergente par rapport aux autres souches SIVcpz. En considérant que SIVcpzAnt est le seul isolat provenant du *P. t. schwenfurthii*, ces différences peuvent être interprétées comme résultantes d'une ancienne séparation entre les virus infectant les différentes sous-espèces de chimpanzés (214), d'une ancienneté comparable avec ceux qui ont généré les divergences entre les différents clades SIV infectant les différentes espèces des singes verts africains. Cependant, l'isolat provenant du *P. t. velorossus* (SIVcpzCam4) est le résultat d'une contamination nosocomiale (231). L'ensemble de ces données montre que pour l'instant on ne dispose pas des lentivirus infectant deux sous-espèces de chimpanzés (*P. t. velorossus* et *P. t. verus*) et que donc on n'a pas de preuves de l'infection SIV *in natura* de ces deux sous-espèces (231; 236). Aussi, il n'y a aucune preuve pour l'instant de l'infection du chimpanzé pygmée (*Pan paniscus*) par les SIV, en dépit des études faites sur le terrain (237).



**Figure 6: Les relations phylogénétiques entre les membres de la lignée SIVcpz /VIH-1 (209).**

On peut observer que les souches VIH-1 sont mélangées parmi les souches SIVcpz, ce qui suggère la transmission zoonotique du VIH-1 (214).

Enfin, la publication récente de deux nouvelles souches SIVcpz rapportées contenir des fragments génomiques apparentés aux VIH-1 group M (238) a été contestée par l'ensemble de la communauté scientifique, faute d'analyse de l'ADN mitochondrial pour prouver l'origine simienne de ces ADN<sub>s</sub>.

La prévalence réduite de l'infection SIV chez les chimpanzés, associée à d'autres facteurs, parmi lesquels le degré important de divergence entre le SIVcpzAnt et les autres souches, a remis en question l'hypothèse que le chimpanzé représente un réservoir naturel des SIV. Plusieurs groupes d'étude ont avancé l'idée que le chimpanzé, comme l'homme pourrait recevoir le virus d'une tierce espèce de primate africaine, pour l'instant non-identifiée (236). Cependant, le nombre croissant des isolats SIVcpz et les informations concernant les sous-espèces de primate d'origine de ces isolats et aussi les considérations concernant l'origine géographique des SIVcpz et VIH-1, indiquent que les chimpanzés ont représenté la vraie source du VIH (214; 231). Les relations phylogénétiques entre les différentes souches VIH-1 ont permis la classification en trois clades distincts, les groupes M (majeur), N (new, ou non-M-non-O) et O (outlier) (239; 240). Si, dans la construction des arbres phylogénétiques des VIH-1 sont inclus les souches SIVcpz, les virus des chimpanzés se regroupent avec les isolats VIH-1 de groupe N (241) séparant les deux autres groupes M et O. Ceci suggère que les trois groupes aient émergé suite à des transferts inter-espèces différents (214; 239). Tous les VIH-1



sont cependant plus proches des isolats provenant du SIVcpz originaires du *P. t. troglodytes* que de l'isolat SIVcpzAnt provenant du *P. t. schweinfurthii* (Figure 6) ce qui démontrerait que la première espèce de chimpanzés et non la deuxième représente la source du VIH-1 dans la population humaine (214; 231). Ces données de phylogénie moléculaire sont soutenues par des données épidémiologiques:

- L'origine du VIH-1 M a été postulée en Afrique Equatoriale (242).
- L'espèce *P. t. troglodytes* est présente au Cameroun, au Gabon et dans les pays voisins de l'Afrique Centrale
- Le groupe N n'est pas le seul groupe détecté au Cameroun, car l'absolue majorité des souches groupe O proviennent de cette région (243). Bien que le groupe M ait une distribution universelle, la plus grande diversité des sous-types de ce groupe est rencontré aussi en Afrique Centrale (Cameroun, Zaïre, Gabon). Finalement, la plus ancienne souche VIH-1 connue jusqu'à présent est originaire de la même région de l'Afrique Centrale (Léopoldville, 1959) (244).

Des analyses récentes permettent d'estimer que l'émergence de la souche VIH-1 M se serait produit entre 1910-1940 (245).

## 2.2. La lignée SIVsm/SIVmac/VIH-2

Le deuxième virus de l'immunodéficience humaine, VIH-2 est apparenté aux lentivirus isolés des mangabés et macaques. La première évidence concernant cette lignée a été obtenue au début des années 1980, quand une épidémie de lymphomes et d'affections liées à l'immunodéficience (similaires au SIDA) ont été observés dans une colonie de macaques rhésus (*Macaca mulata*) captifs dans le Centre de Primatologie de New England (246; 247). Cette observation a généré l'isolation d'un virus T lymphotropique, dénommée au début STLV-III (par analogie au VIH-1 qui était nommée à l'époque HTLV-III) et appelé à présent SIVmac ou SIVsmm. Ce virus présentait des analogies antigéniques avec le HTLV-III (248). Par la suite, des SIV ont été isolés chez d'autres espèces de macaques. Dans le Centre de Primatologie de *Washington*, un SIVsmn a été isolé à partir d'un ganglion lymphatique d'un macaque à queue de cochon (*pig-tailed macaque-Macaca arctoides*) qui avait présenté un lymphome et des symptômes analogues au SIDA au début des années 1970 (249). En 1986, un deuxième lentivirus responsable de SIDA, dénommé VIH-2, a été isolé chez des patients humains originaires de l'Afrique de l'Ouest (250). Les analyses moléculaires ont démontré que le VIH-2 était proche des SIV isolés chez les macaques (250). Cependant, uniquement un

petit nombre de macaques en captivité étaient infectés par le SIV (217), et aucun des macaques prélevés en Asie. L'origine naturelle de cette forme de SIV est restée inconnue pendant plusieurs années, jusqu'au moment de la caractérisation du virus (désigné SIVsm) provenant d'un mangabé enfumée (*sooty mangabey-Cercocebus atys*) en captivité. Ce dernier était étroitement lié aux VIH-2 et aux SIV provenant des macaques (5). Dans les années suivantes, des souches SIVsm ont été isolées chez des mangabés sauvages, dans leur habitat naturel, en Afrique de l'Ouest (Guinée-Bissau, Côte d'Ivoire) (46; 218; 251).

Il est accepté que SIVmm, SIVmne et SIVstm provienne d'une transmission accidentelle du SIVsm du mangabé vers les macaques en captivité.

Cette relation étroite entre SIVsm et VIH-2 suggère que les mangabés sauvages infectés par SIVsm en Afrique de l'Ouest puissent être la source de l'infection VIH-2 chez l'homme (5). Au cours des dix dernières années, plusieurs arguments épidémiologiques ont été évoqués pour soutenir cette hypothèse (46; 218; 251-254). Ainsi, il a été démontré que le groupe VIH-2 est un ensemble de différents virus qui présentent des niveaux de divergence qui peuvent atteindre 19% des séquences de nucléotides du gène *gag* (46; 218; 251). Ce qui est remarquable en ce qui concerne la diversité des VIH-2, est le fait que les différents sous-types VIH-2 ne sont pas plus proches entre eux que par rapport aux différentes souches SIVsm (46). De plus, les lignées phylogénétiques VIH-2 et SIVsm sont intriquées (Figure 7). Finalement, les souches VIH-2 et SIVsm présentent des groupements de nature géographique au Liberia et en Sierra Leone (46). Toutes ces observations indiquent que l'émergence du VIH-2 s'est produite suite à plusieurs évènements de transferts inter-espèces mangabé-homme (209). Cette hypothèse repose sur l'utilisation des mangabés comme animaux de compagnie en Afrique de l'Ouest (218). De plus, SIVsm a déjà été transmis accidentellement chez l'homme suite à des accidents de laboratoire avec exposition au sang de mangabés (255).

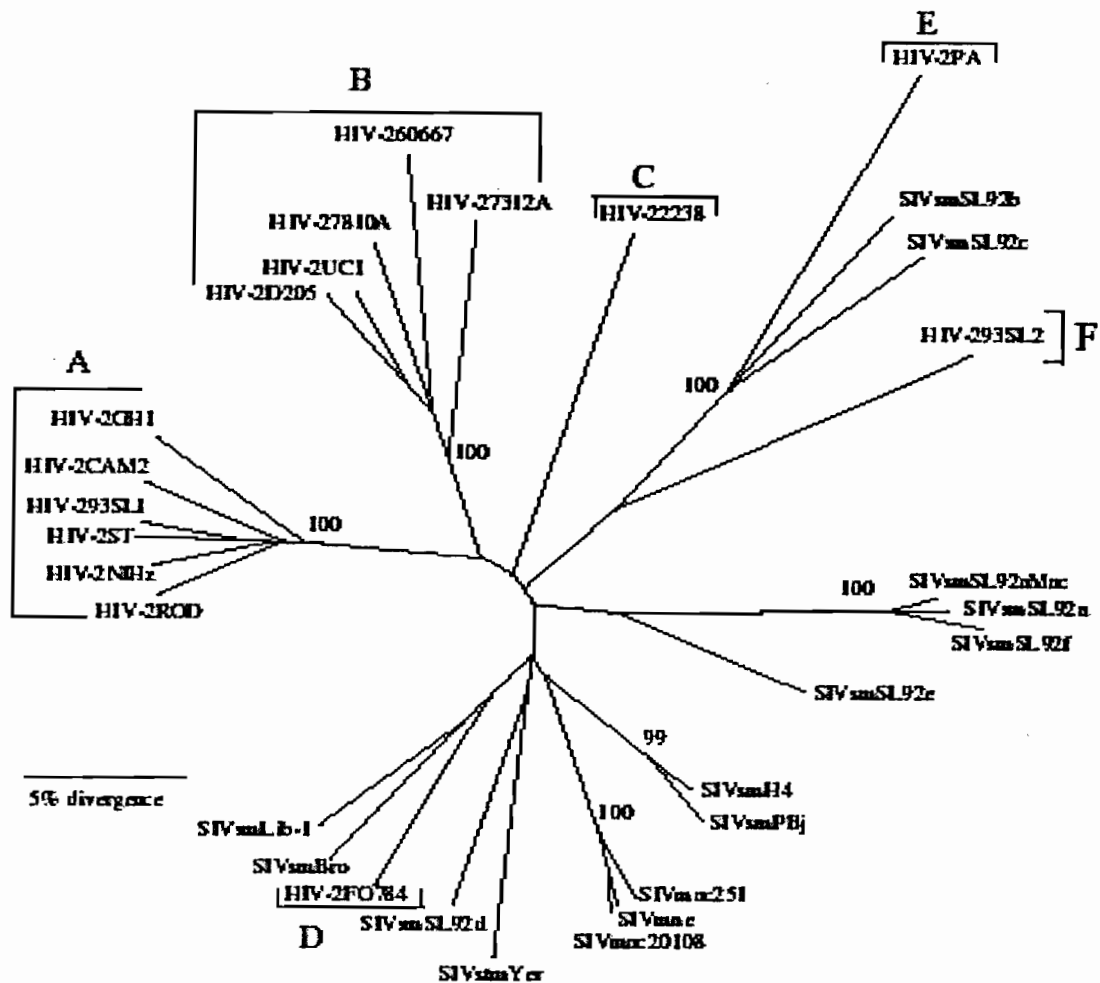


Figure 7: Les relations phylogénétiques des membres de la lignée SIVsm/SIVmac/VIH-2 (252).

### 2.3. La lignée SIVagm

Parmi les primates sauvages porteurs de SIV, les singes verts africains sont les plus nombreux, présentent la plus large distribution géographique et les plus forts taux de prévalence de l'infection SIV (7; 156; 210; 220; 226; 256).

Les singes verts africains couvrent la quasi-totalité de l'Afrique sous-saharienne et sont inclus dans le genre *Cercopithecus*, groupe aethiops, qui contient quatre espèces (257): le grivet (*Cercopithecus aethiops aethiops*), le vervet (*C. a. pygerythrus*), le tantal (*C. a. tantalus*) et le sabaeus (*C.a. sabaesus*). Ces quatre espèces peuvent être définies sur la base des marqueurs phénotypiques et génotypiques différents, et présentent des localisations géographiques différentes. Ainsi, les grivets sont présents en Ethiopie et Soudan, les vervets

peuvent être observés en Afrique de l'Est et du Sud, les tantales sont prévalant en Afrique Centrale tandis que les sabaeus sont localisés en Afrique de l'Ouest.

Au début, le SIV isolé chez les singes verts a été décrit comme un seul groupe de virus présentant un fort degré de diversité génétique (225; 258). Par la suite, il a été démontré que les 4 espèces de singes verts portent chacune des virus spécifiques, étant ainsi démontré que des formes SIVagm distinctes ont connu une évolution identique à l'évolution de leur espèce hôte. Les différents SIVagm infectant les différentes espèces de singes verts ont été dénommés SIVagm.Ver, SIVagm.Gri, SIVagm.Tan, SIVagm.Sab (19; 210; 222-227; 258; 259). SIVagm.Ver est le mieux caractérisé et des nombreux clones contenant ce virus ont été générés, parmi lesquelles SIVagm.Ver3, SIVagm.Ver9063, SIVagm.Ver155, SIVagm.Tyo (19; 210; 221; 225). Parmi les isolats SIVagm.Ver, des différences pouvant atteindre 20 % dans les séquences des protéines Pol ont été décrites (184). Les distances génétiques dans la structure des protéines gag entre les souches SIVagmGri-1 et SIVagmVer155 sont de 30% (225; 227). SIVagm isolé chez les sabaeus (SIVagm.Sab) est un virus particulier parce qu'il a une structure de mosaïque génomique. Des portions de son génome (l'extrémité 3' du gène *gag* et le bout 5' du gène *pol*) sont groupées avec des souches appartenant à la lignée VIH-2 /SIVsm, tandis que le reste du génome est groupé avec la lignée SIVagm (224). Ces données suggèrent que dans l'évolution du SIVagm.Sab, il se soit produit un événement de recombinaison génétique à la suite d'un transfert inter-espèce. Les virus appartenant aux deux lignées originaires (SIVagm.Sab et SIVsm) infectent des singes dont l'habitat est l'Afrique de l'Ouest. Le virus hybride a probablement présenté des avantages sélectifs par rapport aux deux parentaux, puisque c'est à présent la seule forme virale qui infecte le sabaeus.

Des virus de type SIVagm ont été isolés accidentellement chez d'autres espèces que les singes verts africains, ce qui reflète probablement des transferts récents inter-espèces *in natura*. Par exemple, deux babouins jaunes (sur 279) sauvages de Tanzanie (*Papio hamadryas cynocephalus*) étaient séropositifs pour SIVagm dans cette région qui est occupé par des vervets (*C. pygerythrus*) eux même séropositifs pour SIVagm (60% de séoprévalence) (260). Les analyses phylogénétiques des séquences virales des virus provenant de ces deux animaux ont relevé que les virus de babouins étaient groupés avec les virus des vervets dans les fragments *env* et *gag* analysés (261). Par ailleurs, un babouin *chacma* (*Papio ursinus*) d'Afrique du Sud était infecté par une souche SIVagm très proche du SIVagm.Ver (262). Dans une autre étude, un singe patas sauvage (*Erythrocebus patas*) du Sénégal a été démontré comme étant infecté par une souche SIVagm proche de la souche infectant le singe vert de la

même région d'origine, le *sabaeus* (263). Finalement, un mangabé à crête blanche (*Cercocebus lunulatus*) a été dépisté dans un zoo comme étant infecté par un virus de vervet (264). Cependant cette transmission inter-espèce est probablement survenue en captivité parce que les mangabés à crête blanche sont originaires de l'Afrique de l'Ouest, la région de prévalence du *sabaeus*.

#### 2.4. La lignée SIVsyk

Comme les singes verts africains, le singe du Syke (*Cercopithecus mitis albogularis*) présente une forte prévalence de l'infection SIV (164). Cependant, pour le moment, un seul clone intégral de SIVsyk a été décrit et caractérisée (17) et le seul virus apparenté au SIVsyk a été décrit chez les talapoins, mais seulement sur la base d'un fragment partiel (265). A la différence des autres lignés phylogénétiques des SIV, SIVsyk présente un tropisme très restrictif *in vitro*, ce virus étant capable de réplication préférentielle sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) enrichies en cellules CD4<sup>+</sup> provenant du Syke, mais pas sur ceux d'homme, mangabés ou macaques (164). Cependant, les macaques inoculés *in vivo* avec du SIVsyk présentent une infection persistante, toutefois ne présentent pas des signes cliniques (17).

#### 2.5. La lignée SIVlhoest

Cette lignée est formée par des virus isolés des espèces différentes, l'*hoesti* (*Cercopithecus l'hoesti*), *solatus* (le singe à queue de soleil) (*Cercopithecus solatus*) et le mandrill (*Mandrillus sphinx*). Le virus isolé chez le mandrill, SIVmnd-1, qui provient d'un animal du Gabon, a été décrit pour la première fois il y a 10 ans au CIRMF (18; 229) et il est longtemps resté le seul représentant de la "lignée SIVmnd". Cependant, les isolats récemment caractérisés SIVlhoest et SIVsun ont été rattachés à la même lignée phylogénétique que SIVmnd (180; 228; 230). L'habitat du mandrill est superposé sur celui du *solatus* en Afrique Ouest-équatoriale, tandis que l'*hoesti* peuple une surface située à 1.600 km à l'Est. D'un autre côté, les virus SIVlhoest et SIVsun sont plus proches entre eux que de SIVmnd (Figure 5). La relation étroite entre SIVlhoest et SIVsun se superpose à la relation étroite entre les deux espèces hôtes (Figure 4) qui ont été classées dans la même super-espèce (266); les mandrills sont très différents de ces deux espèces. La prévalence de l'infection par le SIVlhoest semble être élevée chez les singes l'*hoesti* sauvages, 57% sur 14 animaux (230). L'ensemble de ces

observations suggère que cette lignée SIV ait infecté les singes de la super-espèce l'hoesti il y a très longtemps et que la spéciation entre SIVlhoest et SIVsun est survenue au moment où les deux espèces hôtes ont perdu leurs ancêtres communs, avant leur séparation géographique. Ce phénomène constitue un nouvel exemple d'évolution dépendant de l'hôte, identique à l'évolution des SIVagm dans les espèces de singes verts africains. La prévalence du SIVmnd chez les mandrills sauvages n'étant pas très bien définie jusqu'à présent et la découverte d'un nouveau virus chez les mandrills (15) sont les raisons pour lesquelles il a été suggéré que cette lignée doit être renommée SIVlhoest plutôt que SIVmnd (228).

La présence des virus étroitement apparentés chez des hôtes éloignés du point de vue phylogénétique (cercopithèques et mandrills) démontre l'existence des transferts inter-espèces survenues dans le passé. A cause de leur étroite relation, ni le SIVsun ni le SIVlhoest ne peuvent constituer l'ancêtre direct du SIVmnd. Il est cependant possible que le SIV soit transmis du mandrill chez un ancêtre commun du l'hoesti et du solatus, mais les spécialistes sont d'accord pour considérer que les premiers à être infectés ont été les cercopithèques. Il serait extrêmement intéressant de savoir si le singe du Preuss (*Cercopithecus preussi*), qui est étroitement apparenté aux l'hoesti et solatus (Figure 4) (266; 267) et dont l'habitat est superposé sur celui du mandrill, est naturellement infecté par le SIVet quelles sont les relations entre ce virus hypothétique et les SIVlhoest, SIVsun et SIVmnd-1.

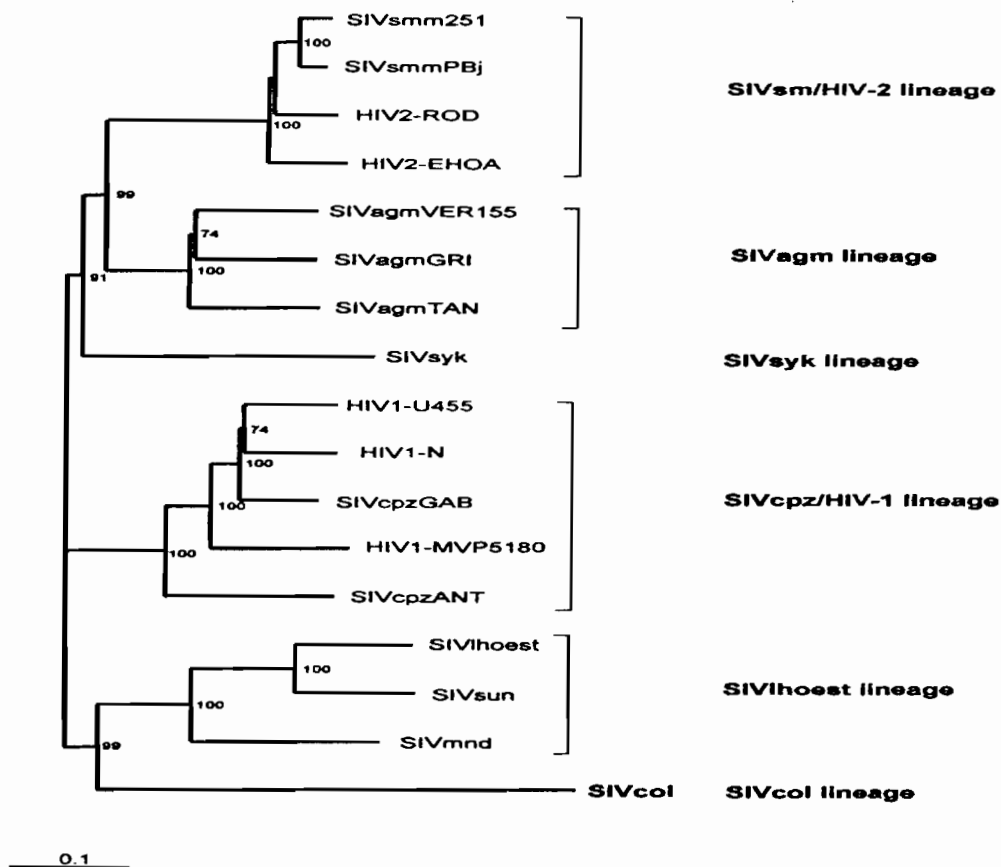
## 2.6. La lignée SIVcol

Une étude récente (213), a montré que le colobe (*Colobus guereza*) est naturellement infecté par un nouvel SIV, SIVcol, qui est le représentant d'une nouvelle lignée phylogénétique des lentivirus de primates non-humains (Figure 8). La découverte de ce virus est d'une grande importance pour l'évaluation de la spéciation des lentivirus des primates: La famille *Cercopithecidae* (les singes de l'Ancien Monde) est divisée en deux sous familles, les *Colobinae* et les *Cercopithecinae* qui se sont séparés il y a 11 millions d'années. Le fait que le virus infectant le *C. guereza* soit très divergent, en comparaison avec les autres lentivirus des primates, suggère que la présence de ce virus chez les Colobes est très ancienne, et que la divergence du virus reflète probablement la divergence de l'espèce hôte et non pas une transmission inter-espèce.

L'ensemble des données suggère une présence très ancienne des lentivirus de primates non-humains chez les singes d'Afrique, beaucoup plus ancienne que ne le laissent penser les

"horloges moléculaires" des analyses phylogénétiques qui établissent la divergence des lentivirus des primates il y a 200 ans (268-270).

L'analyse de la présence des lentivirus reliés aux SIVcol chez les *Colobidae* d'Asie devrait nous aider à clarifier, si l'ancêtre commun des SIV était déjà présent chez l'ancêtre commun des *Cercopithecoidea* ou si une transmission cross-spécifique est survenue entre les *Cercopithecoidea* et les *Colobinae* ou enfin, si le virus provient d'une autre espèce non-identifié jusqu'à présent.



**Figure 8 : Les relations phylogénétiques entre SIVcol et les autres virus des primates (213).**

## 2.7. Les lentivirus non-classifiés

Il existe au moins des évidences sérologiques de l'infection SIV chez d'autres espèces des primates non-humains de l'Afrique et de plus, il existe encore des espèces de primates non-humains qui n'ont pas encore été testés systématiquement pour l'étude des SIV. Chez certaines espèces les virus isolés montrent une structure complexe qui ne permet pas la classification. Certains de ces virus ne sont pas encore complètement caractérisés.

### 2.7.1. SIVrcm, SIVmnd-2, SIVdrill

Une de ces variantes virales, SIVrcm a été isolée au CIRMF du mangabé à crête rouge (*Cercocebus torquatus torquatus*) (14). Le mangabé à crête rouge est étroitement relié au mangabé enfumé (Figure 4) et dans certaines classifications, les deux animaux ont été placés dans la même espèce. Cependant, le SIVrcm ne paraît pas être apparenté au SIVsm (Figure 9) (14). Dans les analyses phylogénétiques basées sur les séquences gag (318 acides amines), SIVrcm est approximativement équidistant des lignées SIVsm et SIVagm. Cependant, dans les analyses des séquences pol (155 acides aminés), le SIVrcm était plus proche de lignée SIVcpz /VIH-1 que de toutes les autres lignées. Ces discordances de clustering dans des régions phylogénétiques différentes suggèrent une recombinaison entre des lignées phylogénétiques différentes, similaire à celle survenue dans l'évolution du SIVagmSab.

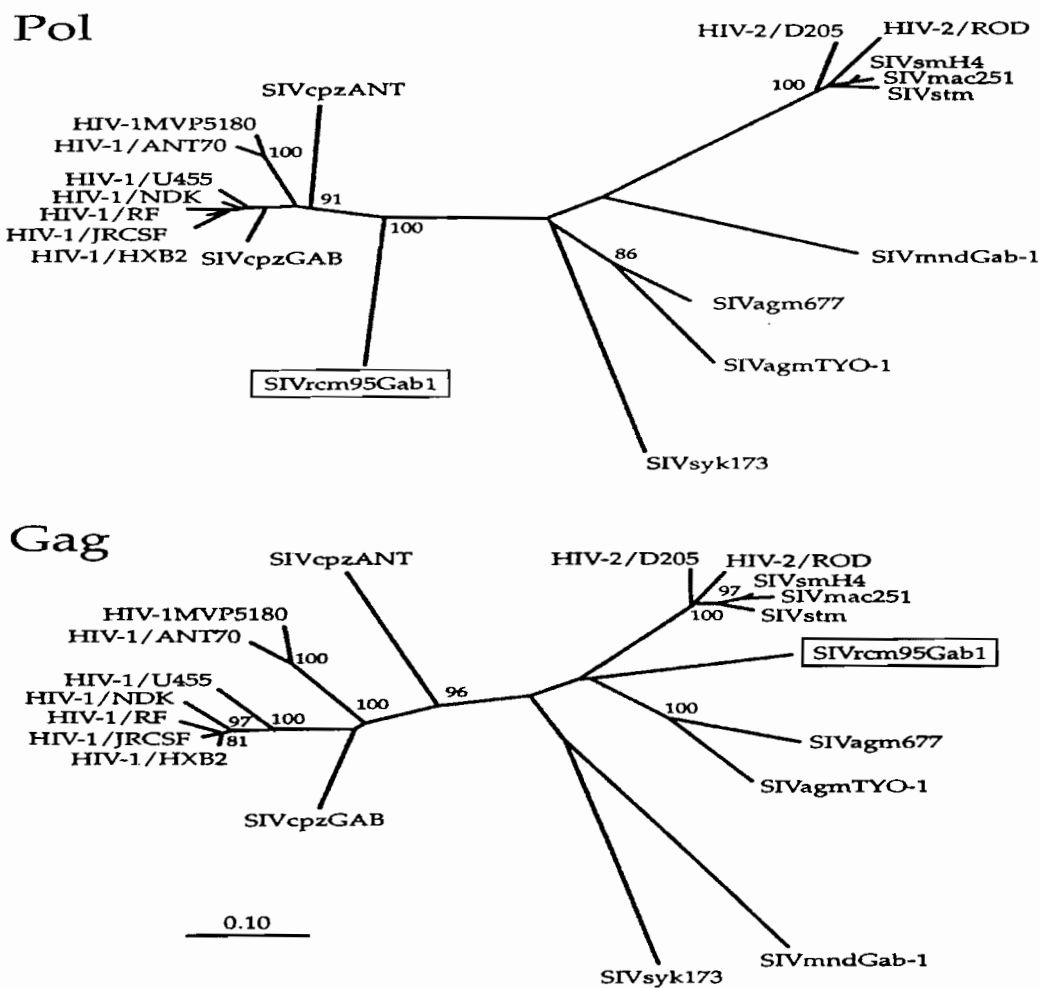
Le deuxième virus du mandrill (SIVmnd-2) a été récemment caractérisé chez des mandrills captifs ou sauvages du Gabon et Cameroun (15). Les séquences complètes sont actuellement disponibles et les analyses phylogénétiques ont montré que dans les régions gag et pol le SIVmnd-2 isolé des mandrills vivant en semi-liberté dans la colonie de mandrill du CIRMF, sont groupés avec le SIVrcm, isolé du *Cercocebus torquatus*, alors que dans le gène env il est groupé avec le SIVmnd-1, ce qui suggère un événement de recombinaison entre le SIVmnd-1 et le SIVmnd-2 chez les mandrills (voir article dans le chapitre Résultats I.3).

Un autre SIV isolé et caractérisé récemment a été obtenu du drill (*Mandrillus leucophaeus*) (271). Les drills sont étroitement apparentés avec les mandrills (Figure 4), mais le SIVdrl n'est pas apparenté au SIVmnd-1, mais uniquement au SIVmnd-2. Les analyses phylogénétiques des séquences pol (787 pb) ont relevé que le SIVdrl et la SIVmnd-2 clusterisent avec le SIVrcm, bien que les distances dans les structures nucléotidiques soient



d'environ 30% (271). Les séquences complètes rapportés récemment, ont montré que le SIVdrl est très proche du SIVmnd-2 tout au long de son génome (272).

Ces données (272), ont montré que les trois virus SIVrcm, SIVdrl et SIVmnd-2 sont groupés ensemble dans les régions *gag-pol-vif* et divergent du SIVmnd-1 dans ces mêmes régions. Aussi, les trois virus SIVrcm, SIVdrl et SIVmnd-2 clusterisent dans les gènes *env* et *nef* avec la lignée SIVhoest. Ces résultats posent le problème de l'origine du SIVmnd, soit que le SIVmnd-1 ait été cross-transmis de l'hoesti au mandrill, et que le SIVmnd-2 résulterait d'une contamination du SIVrcm ou du SIVdrl au mandrill et vice versa. L'analyse de ces données ne permet pas à l'état actuel des connaissances de conclure avec exactitude sur l'origine de ces virus.



**Figure 9 : Les relations phylogenetiques des genes *gag* et *pol* pour le SIVrcm (14)**

### 2.7.2. SIVtal

Des études sérologiques ont montré que le talapoin (*Miopithecus talapoin*) était infecté par des lentivirus. Un petit fragment *pol* (550 pb) a été obtenu pour ce virus et les analyses phylogénétiques ont montré que le virus le plus proche du SIVtal (bien que distant) est le SIVsyk (265). SIVtal et SIVsyk présentent 56% de similitudes dans les structures aminoacides dans la région étudiée, raison pour laquelle le SIVtal a été suggéré être le représentant d'une nouvelle lignée phylogénétique des lentivirus des primates (273). Cependant, des conclusions définitives nécessitent l'analyse de fragments génomiques plus importants.

### 2.7.2. SIVdeb, SIVmona, SIVwol, SIVasc

Les séquences *pol* des SIVmona et SIVdeb isolés respectivement des singes Mona (*Cercopithecus mona*) et de De Brazza (*Cercopithecus neglectus*) ont été réalisées et le SIVmona apparaît dans cette région comme une lignée distincte des six lignées connues jusqu'à présent. Aussi, un fragment du gène *pol* du SIVgsn isolé du singe au nez blanc (*C. nictitans*) a été séquencé et montre que ces virus sont équidistant les uns des autres (274). Ces résultats demandent d'être confirmés (11). Les virus des *Cercopithecus wolffi* et *Cercopithecus ascanius* ont été amplifiés. Les séquences complètes pour l'un des SIV, et partiel pour l'autre SIV, indiquent que SIVwol et SIVasc sont regroupés dans la lignée du SIVsyk, mais sont très distant de la lignée SIVlhoest (12), les analyses en cours permettront de confirmer ces données. Récemment, il a été caractérisé dans la famille des *colobinae*, notamment chez les colobus rouge (*Ptilocolobus badius*) et colobus olive (*Procolobus versus*) des SIV dont les analyses phylogénétiques ont montré que les séquences *pol* de ces virus se regroupaient ensemble, dans un groupe différent de la lignée SIVcol, mais proche de la lignée SIVlhoest (275).

Des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines spécifiques des SIV ont été aussi détectés en testant des sérums des singes moustachus (*C. cephus*), du singe de Diana (*C. diana*), du singe du campbell (*C. campbelle*) du singe d'Allan (*Allenopithecus nigroviridis*) du babouin jaune (*Papio cynocephalus*) et du babouin de Guinée (*Papio papio*) (6; 7; 44; 228). Evidemment, l'isolement et la caractérisation de ces virus seraient d'un plus grand intérêt. Des telles analyses sont nécessaires pour obtenir des données supplémentaires concernant l'origine

et l'évolution des lentivirus des primates non-humains, pour comprendre dans les moindres détails les voies de transmission de ces virus et pour élucider l'ampleur des transferts inter-espèces entre les différentes espèces des primates mais aussi entre les primates et l'Homme.

En résumé, des évidences d'infections par SIV ont été rapportées pour 26 espèces différentes des primates non-humains et le potentiel de l'exposition de l'homme à ce virus a augmenté pendant ces dernières années, ce qui est suggéré par des études épidémiologiques montrant l'émergence de ces infections (209). L'identification des nouveaux SIVs chez les primates sauvages pourrait aider à élucider les origines et l'évolution de l'infection VIH chez l'homme et l'étude des virus simiens pourrait servir de sentinelle pour comprendre le potentiel de l'émergence des nouveaux virus dans la population humaine. Les antigènes de ces virus simiens pourraient être inclus dans les tests sérologiques courants (213).

## **IV. Les infections lentivirales chez les primates non humains**

### **1. Histoire naturelle comparée de l'infection lentivirale chez l'homme et le singe**

#### **1.1 Rappel de la pathogenèse lentivirale**

L'infection SIV chez le macaque présente quelques similitudes avec l'infection VIH. Le nombre de particules virales en circulation, le niveau de progression de la maladie (déterminé par le déclin des cellules T CD4<sup>+</sup>) et le développement des infections opportunistes sont toutes qualitativement similaires, et aussi variable que dans l'infection VIH chez l'homme. L'évolution spécifique de la maladie dépend du virus utilisé, de l'espèce, de l'individu et de la voie d'inoculation.

L'apparition ou non de la maladie dépend d'interactions multiples et complexes entre le virus et son hôte. La question fondamentale qui permet donc de comprendre comment l'infection des cellules T CD4<sup>+</sup> et des CPA (cellules présentatrices de l'antigène) par le VIH-1 aboutit à une immunodéficience terminale n'est pas encore totalement résolue. Toutefois, plusieurs facteurs à savoir, outre les facteurs intrinsèques de l'hôte, la variabilité du virus, l'échappement viral, la charge virale, les réservoirs viraux, la dissémination et la persistance virale, semblent être mis en cause.

## 1.2 Les différentes phases de l'infection VIH

L'évolution clinique des personnes infectées par le VIH peut être séparée en trois phases : la primo-infection, la phase chronique et la phase terminale.

### 1.2.1 La primo-infection

La primo-infection VIH survient à partir de l'exposition au virus et dure six semaines en moyenne. Elle se traduit par des manifestations cliniques variées suivant les cas, elle peut être asymptomatique ou se traduire, chez environ 50 à 70% des sujets infectés, par diverses manifestations cliniques transitoires (276-278). La plus fréquente est un syndrome mononucléosique dont les symptômes correspondants sont, par ordre de fréquence, des adénopathies persistantes et généralisées, cervicales et axillaires disséminées, une fièvre au long court, des myalgies et des éruptions cutanées. Des manifestations neurologiques non spécifiques ont été décrites dans 30% des cas. Il a été montré que la présence d'adénopathies cervicales et de symptômes oropharyngés ou d'oesophagites semblent associées à un risque plus élevé d'évolution vers le stade B ou C, en comparaison à des personnes dont la primo-infection est asymptomatique (279).

Sur le plan virologique, cette phase est caractérisée par une réplication virale conduisant à une détection d'un taux significatif d'antigène aussi bien dans le sang circulant qu'au niveau du liquide céphalo-rachidien (280). La charge virale dans les tissus lymphoïdes est plus importante que la charge circulante (281; 282) conduisant à l'établissement de sites privilégiés de la réplication virale à partir desquels a lieu la dissémination virale pendant tout le cours de l'infection (276; 283). 40 à 50% de virus isolés de personnes infectées en phase de primo-infection, utilisent le co-récepteur CXCR4. La fin de la phase de primo-infection est marquée par une diminution rapide de la charge virale circulante (284; 285) et un changement phénotypique des virus isolés qui sont majoritairement R5 (l'utilisation du co-récepteur CCR5).

Du point de vue immunologique, on observe une diminution du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants et l'apparition de la réponse immune cellulaire (286-290). Au niveau ganglionnaire, on note une hyperplasie folliculaire consécutive à la prolifération active des lymphocytes B et l'expansion du réseau des cellules folliculaires dendritiques (283; 291). L'apparition d'anticorps anti-VIH traduit la fin de la phase de primo-infection et l'entrée dans la phase chronique (285; 292). Le rôle de la réponse humorale dans le contrôle de la

réplication VIH durant la primo-infection reste obscur. La plupart des études ont démontré que les anticorps neutralisants n'étaient détectés qu'au moment du déclin initial de l'ARN plasmatique du VIH (293-296). Néanmoins, les épitopes des anticorps neutralisants ont pu être identifiés durant la phase aiguë (296; 297), suggérant la possibilité que l'activité de ces anticorps a échappé aux tests généralement disponibles.

Alors que le taux d'antigène plasmatique chute à un niveau non détectable, les concentrations d'ARN plasmatique du VIH se stabilisent à un niveau relativement constant chez le même individu (*viral set point*) (298-300). L'émergence de variants viraux est corroboré à la valeur prédictive de la concentration de l'ARN plasmatique du VIH, ce qui soutient l'hypothèse que l'interaction initiale virus-hôte contribue au contrôle du virus et peut être la clef dans l'établissement de l'évolution de la maladie VIH (301).

### **1.2.2 La phase chronique asymptomatique**

Elle succède à la primo-infection et correspond à la catégorie B de la classification du CDC. Elle se caractérise par une latence clinique et dure en moyenne une dizaine d'années (302) en l'absence de thérapeutiques efficaces.

L'antigénémie p24 est indétectable, cependant la charge virale persiste; elle constitue la résultante entre la production et l'élimination des particules virales (303-305). Par ailleurs, une augmentation du nombre de cellules CD8<sup>+</sup> est observée dès la primo-infection et se poursuit durant cette phase, ce qui conduit à une inversion du rapport CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (306). Dans les mois suivants et jusqu'à la survenue des premiers symptômes, le nombre de cellules CD8<sup>+</sup> reste élevé.

La plupart des réponses immunes et cellulaires mise en place pendant ou après la primo-infection, se maintiennent pendant toute la durée de la phase chronique (307; 308). Toutefois, les fonctions des cellules T CD4<sup>+</sup> auxiliaires sont modifiées, tout au début de cette phase, comme le montre la perte de capacités de prolifération des cellules en réponse aux antigènes de rappel, et une chute régulière du nombre de T4 qui à terme emmène une nouvelle inversion définitive du rapport CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (306).

### **1.2.3 La phase terminale**

La progression vers la phase terminale constitue la phase SIDA proprement dite, elle dure en moyenne deux à trois ans en absence de traitement, et aboutit au décès du patient. Du

point de vue clinique, elle est caractérisée en outre par une lympho-adénopathie persistante et généralisée observée lors des deux phases précédentes et par l'apparition de pathologies opportunistes classée dans la catégorie C du CDC.

Le début de cette phase terminale chez les sujets infectés est annoncée par une forte augmentation de la charge virale circulante et tissulaire (304; 309), par la réapparition de l'antigénémie p24 et par la chute plus rapide du taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> (Figure 9). 50% des isolats viraux isolés chez ces patients sont de phénotype X4 et présentent plusieurs caractéristiques que l'on associe à une virulence élevée, comme une plus large utilisation de co-récepteurs, une haute capacité répliquative *in vitro*, une résistance à la neutralisation et la sensibilité aux anticorps facilitant (310-313).

Lorsque l'individu développe des symptômes, le nombre de T CD4<sup>+</sup> périphériques est généralement inférieur à 200 cellules/ $\mu$ l de sang. On note également une diminution concomitante du taux d'anticorps anti-p24 circulants et des réponses antivirales à médiation cellulaire (276; 308; 314-316), ainsi qu'une destruction des tissus lymphoïdes (317; 318). Ces événements conduisent à l'immunodéficience terminale, caractérisée par une profonde déplétion lymphocytaire qui précède le décès de la personne infectée.

### 1.3. Facteurs pronostiques

De nombreuses études ont montré que le niveau du VIH dans la plasma au moment de la séroconversion est prédictif de la progression du SIDA (300; 319-323). Ceci n'a pas été observé dans toutes les études (324), les discordances étant attribuées aux différents facteurs tels que l'échantillon type, la cohorte étudiée, et la prise d'échantillon après séroconversion.

L'infection VIH-1 peut présenter un large spectre d'évolution clinique variant d'un développement rapide du SIDA à une infection non progressive à long terme. Des études suggèrent que les facteurs viraux et de l'hôte influencent l'évolution variable de la maladie lentivirale. La pathogénicité, le volume de l'inoculum, la complexité de la quasi-espèce, et la voie d'inoculation peuvent jouer des rôles dans la progression de la maladie (325-327). Des exemples divergents de la progression de la maladie suivant l'infection à partir d'une source virale commune ont été cités; il s'agit des réponses différentielles de l'hôte vis à vis du VIH (328-330). Les facteurs de l'hôte qui pourraient affecter l'évolution de la maladie incluent la susceptibilité à l'infection VIH-1 des cellules cibles de l'hôte, l'immunité innée et l'acquisition d'une résistance immune. Le polymorphisme hérité dans les gènes codant les

récepteurs à chimiokines et les chimiokines ont aussi été liées à l'évolution de la maladie VIH sans que cette observation soit confirmée (331-336).

Les valeurs des lymphocyte CD4<sup>+</sup> sont prédictives pour la progression de la maladie chez les sujets infectés par le VIH (337-339). Des CD4<sup>+</sup> inférieurs à 200 cellules/mm<sup>3</sup> en plus des symptômes sont considérés comme une indication pour initier la prophylaxie de *Pneumocystis carinii* (340; 341).

Les marqueurs d'activation immuns, particulièrement les niveaux dans le sérum de néoptérine et de β2-microglobuline, sont prédictifs pour la progression de la maladie dans les études épidémiologiques (342-345). L'activation des marqueurs immuns expliquent l'efficacité clinique de la thérapie de la zidovuline, mais tous ces marqueurs ont une valeur prédictive significativement plus faible que la charge virale VIH et le comptage des lymphocytes CD4<sup>+</sup> (322; 346). D'autres études ont montré que les niveaux de TNF-α2 dans le sang périphérique sont aussi prédictifs de la progression clinique (347), et qu'elles corrélaient avec les niveaux de l'ARN du VIH-1 (348).

Ces facteurs prédictifs sont associés au moins à deux profils d'évolutions de la maladie, dont l'un est dit « progresser rapide », l'autre « progresser lent ».

#### **1.4. Les différents profils d'évolution**

Les profils d'évolution de l'infection à VIH varient selon les individus (Figure 10).

##### **1.4.1 Les progresser rapides**

Environ 10% des personnes infectées vont développer la maladie seulement deux à trois ans après l'infection (302; 349). Ils possèdent une charge virale plasmatique élevée après la période de primo-infection (313; 350; 351), avec des virus hautement répliquatifs (352-354).

Le taux d'anticorps dirigés contre les protéines du VIH sont généralement faibles (302; 349; 355; 356). Ces anticorps sont peu ou pas neutralisants vis à vis des souches homologues (357; 358) et pourraient même être facilitant (359). Les réponses CTL et l'activité cytolytique non restreinte par le CMH sont altérées au cours du temps et on note une production importante de cytokines inflammatoires et de certains marqueurs sériques traduisant une activation chronique du système immunitaire (360-362).

#### **1.4.2. Les asymptomatique à long terme**

Ils représentent 5 et 10% des sujets infectés par le VIH depuis plus de dix ans qui ne présentent pas de symptômes cliniques et biologiques caractéristiques de la maladie (363; 364). Ils ont une charge virale plasmatique plus faible que chez les " progresseurs rapides ". Cette différence est observée au niveau de la charge virale ganglionnaire qui est plus faible et du piégeage des particules virales par les cellules folliculaires dendritiques qui est moins important [pour revue voir (365)]. Le maintien de la faible charge virale semble notamment liée à l'activité anti-virale suppressive médiée par les cellules CD8<sup>+</sup> (366). Le virus isolé chez ces sujets semblent être phénotypiquement homogène même pour ceux qui vont progresser vers la maladie (367). Des cas d'évolution lente ont pu être associés à la présence du virus défectifs (368-371).

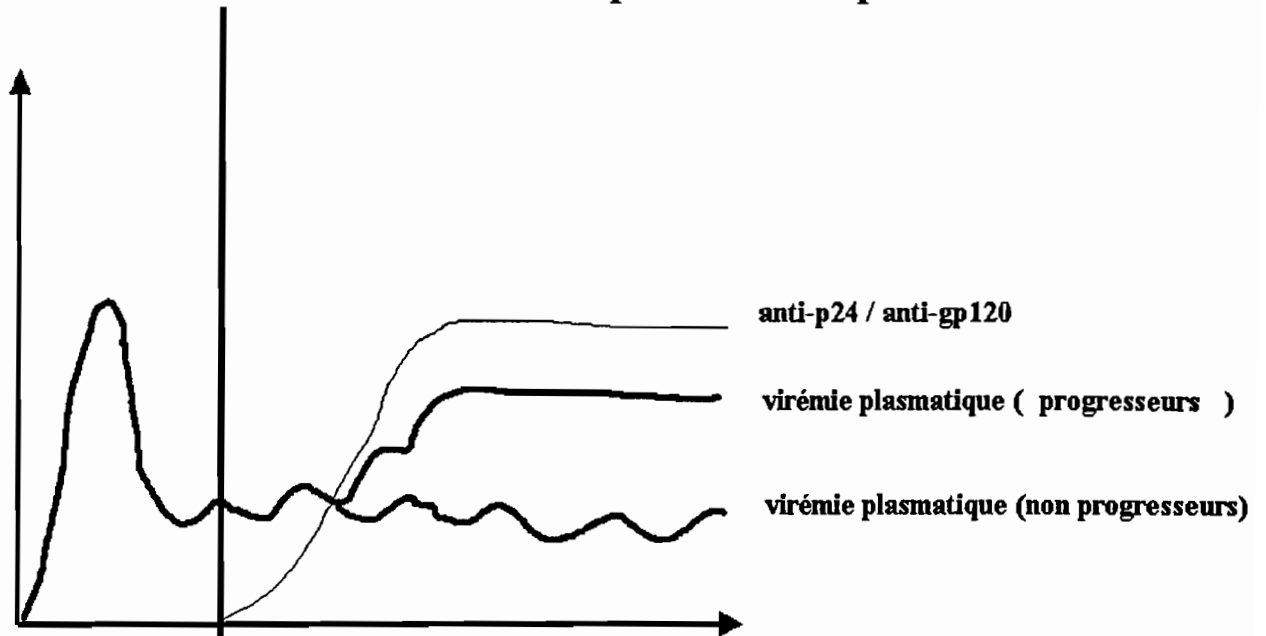
Cependant, la définition des individus asymptomatiques à long terme (ALT) a été souvent arbitraire. Certains auteurs ont par conséquent proposés une définition consensuelle basée sur les critères suivants : (i) une infection documentée pendant au moins sept ans, (ii) un nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> supérieur à 600 cellules/ $\mu$ l et qui ne décroît pas significativement dans le temps, et (iii) une absence d'antécédents de thérapies antivirales et de symptômes cliniques liés au VIH (372). Le taux de lymphocytes TCD4<sup>+</sup> et des réponses immunes cellulaire et humorale sont relativement stables (299; 373). La capacité de réponse proliférative des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à une stimulation antigénique n'est pas altérée (374) et les niveaux d'anticorps neutralisants sont relativement élevés comparativement aux sujets " progresseurs "(296).

#### **1.5. Pathogenèse de l'infection lentivirale chez les primates**

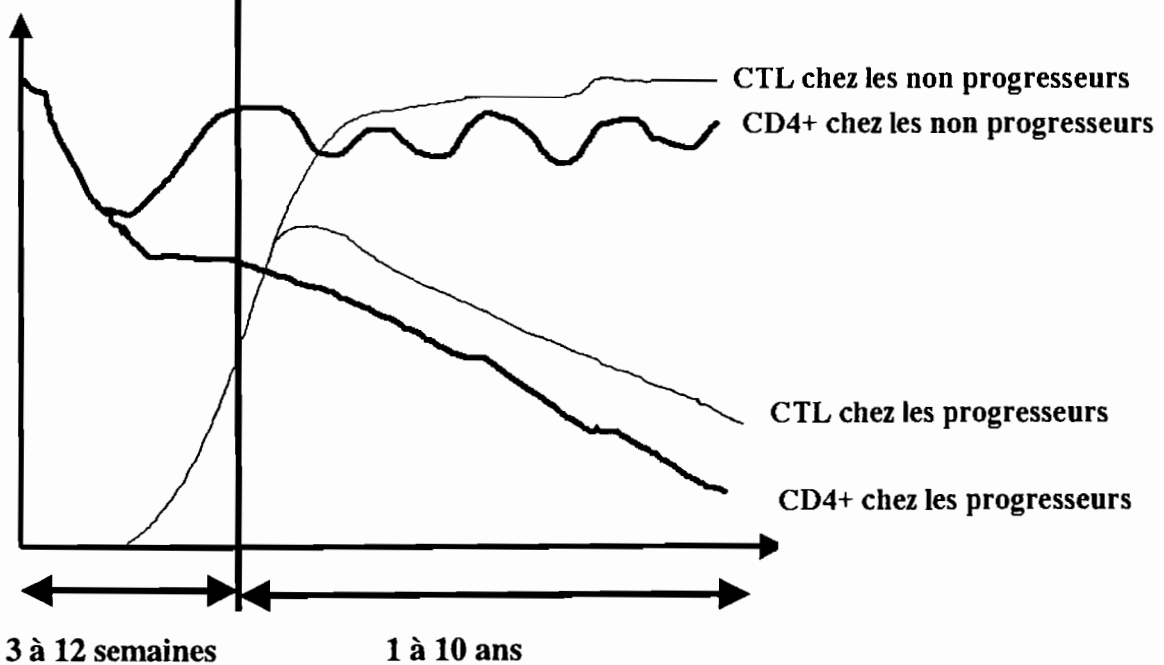
Dans le cas de l'infection VIH, l'évolution latente de la pathologie, la complexité du virus et le nombre important de mécanismes entrant en jeu rendent impossible toute approche strictement *in vivo*. Ainsi le modèle animal est nécessaire : premièrement pour la compréhension de la pathogénicité, deuxièmement pour la démonstration de l'efficacité d'un vaccin et enfin pour la mise au point de protocoles thérapeutiques.



## Evolution de la virémie et de la réponse anticorps



## Evolution des anti-CD4+ et anti-CD8+/CTL



**Figure 10 : Représentation schématique des principaux éléments de la physiopathologie dans l'infection VIH. (a) virémie plasmatique et réponse anticorps (b) évolution des CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>/CTL**

Pour cela le modèle animal doit comprendre des critères incluant: La reproductibilité des phénomènes observés, les similitudes des agents effecteurs et un cadre physiopathologique et clinique proche de l'homme. En outre, il doit posséder une phase de latence clinique suffisamment longue et permettre l'installation de mécanismes physiopathologiques les plus proches possibles de ceux connus ou supposés chez l'homme. Des virus simiens génétiquement apparentés aux VIH-1 et VIH-2 ont été isolés (voir ch. III ). Par ailleurs, à l'image des relations phylogénétiques entre les VIH et SIV, l'on observe des propriétés biologiques similaires entre ces différents virus à tropisme lymphocytaire et monocytaire/macrophagique, la reconnaissance d'un même récepteur à haute affinité (CD4), l'effet cytopathogène *in vitro* et l'identification d'un SIDA chez le macaque infecté *in vivo*.

Pour l'ensemble de ces raisons, l'infection expérimentale des primates par des lentivirus humains ou simiens s'est imposée comme modèle d'étude privilégiée de l'infection à VIH de l'homme. Deux types de modèles d'infection lentivirale sont utilisés, l'un pathogène et l'autre non pathogène (Tableau 1). La comparaison des caractéristiques virologiques et immunologiques devrait aboutir à une meilleure compréhension de la physiopathologie du SIDA.

### **1.5.1. Modèles simiens d'infection pathogène**

Ils résultent tous d'infection expérimentale ou accidentelle (Tableau 1).

#### **1.5.1.1 - Modèle d'infection chez le macaque SIVmac/SIVsm**

L'histoire naturelle de l'infection SIVmac chez le macaque rhésus a montré que le macaque n'était pas l'hôte naturel du SIVmac, mais le résultat d'une infection nosocomiale par le SIV de sooty mangabey transmis lors des partages des cages (176). L'infection du macaque par SIVmac/SIVsm aboutit au SIDA. L'évolution de l'infection SIV chez le macaque se déroule sur une période comprise entre 1 et 3 ans et en trois phases successives comme chez l'homme: primo-infection, période asymptomatique et la période symptomatique accompagnée d'infections opportunistes.

**Tableau 1 : Différents modèles d'infection naturelle ou "accidentelle" lentivirales chez les primates**

Genre/Espèce	Nom commun	Virus isolé	Pathogène	Références
<i>Macaca</i>				
<i>M. mulata</i>	Macaque rhésus	SIVmac	oui	(389)
<i>M. nemestrina</i>	Macaque à queue de cochon	SIVmne	oui	(390)
<i>M. arctoïdes</i>	Macaque à face rouge	SIVstm	oui	(391)
<i>M. Fascicularis</i>	Macaque cynomolgus	SIVmac	oui	(392)
<i>Cercocebus</i>				
<i>C. atys</i>	Mangabey gris	SIVsmm	non	(393)
<i>C. torquatus lunatus</i>	Mangabey à crête blanche	SIVwcm	?	(390)
<i>C. torquatus torquatus</i>	Mangabey à crête rouge	SIVrcm	non	(390)
<i>Cercopithecus</i>				
<i>C. aethiops aethiops</i>	Grivet	SIVagm	non	(256)
<i>C. aethiops pygerythus</i>	Vervet	SIVagm	non	(7)
<i>C. aethiops tantalus</i>	Tantale	SIVagm	non	(226)
<i>C. aethiops sabaesus</i>	Singe vert de l'Ouest	SIVagm	non	(220)
<i>C. mitis albogularis</i>	Cercopithèque à diadème	SIVsyk	non	(164)
<i>Mandrillus</i>				
<i>M. sphinx</i>	Mandrill	SIVmnd	non	(394)
<i>M. Leucocephaleus</i>	Drill	SIVdrl	non	(271)
<i>Pan</i>				
<i>P. troglodytes</i>	Chimpanzé	SIVcpz	?	(216)

L'antigénémie p27 apparaît dès les premières semaines qui suivent l'exposition au virus. Elle reflète une réplication virale active. Cette phase est caractérisée par une baisse transitoire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques (174; 177; 375), non retrouvée au niveau ganglionnaire (376), où on note cependant des anomalies qualitatives des lymphocytes T comme une diminution des réponses prolifératives et de la synthèse d'IL-2 (377). Il a été démontré que le virus se réplique activement dans différents organes lymphoïdes tels que le thymus, les ganglions lymphatiques, la rate et surtout l'intestin (89; 378-381). Au niveau des ganglions, des particules virales infectieuses sont piégées par les cellules folliculaires dendritiques présentes dans les centres germinatifs (379). Cette phase est corrélée à un pic de virémie massive plasmatique et cellulaire qui apparaît environ deux semaines après l'infection, suivi d'une diminution plus ou moins rapide de virus circulant (382; 383). Le niveau auquel se stabilise la charge virale périphérique, six à huit semaines après l'infection, constitue une

bonne valeur prédictive de l'évolution de l'infection (108; 383-385). Au niveau ganglionnaire, on observe la production de cytokines (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-12, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  et TNF $\beta$ ) qui est corrélée avec la réplication virale et persiste pendant les huit premières semaines de l'infection (386; 387). La production importante d'IFN $\gamma$  au niveau des ganglions est inversement corrélée au pic d'antigénémie et est associée à la diminution de la production virale dans ces organes ainsi qu'une progression lente vers la maladie (386). Pendant cette phase, on note également une augmentation de l'expression de RANTES aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau tissulaire (388). La production virale en primo-infection semble induire une réponse CTL spécifique avant d'induire une réponse humorale.

Lors de la séroconversion, les anticorps anti-p27 apparaissent en général deux à quatre semaines après l'exposition au virus. Une charge virale élevée dans les ganglions (379; 395) est fréquemment observée au cours de cette période, avec une concentration de l'ARN viral au niveau des cellules folliculaires dendritiques présentes dans les centres germinatifs.

La phase asymptomatique comparée à celle observée chez l'homme fait état d'un titre en anticorps élevé (177; 395), ainsi que la réponse immune cellulaire spécifique (396-398) et d'une charge virale persistante mais faible (399). Il a été observé, tout comme chez l'homme, que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> joueraient un rôle dans le contrôle de la charge virale pendant cette phase, car la déplétion des cellules CD8<sup>+</sup> durant les phases aiguë et chronique de l'infection SIVmac chez macaque favorise la propagation virale (400; 401). L'augmentation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et TCD8<sup>+</sup> durant cette phase est lié à une régénération rapide de ces cellules après primo-infection, activation induite par le virus (402; 403). Malgré l'absence de signes cliniques pendant cette période qui dure généralement entre un et trois ans avant la mort de l'animal, des anomalies biologiques s'accumulent progressivement.

Par exemple, la capacité des cellules T de proliférer en réponse à un mitogène diminue de façon dramatique et persistante (404), conduisant ainsi à une diminution progressive des cellules CD4<sup>+</sup>, probablement par apoptose (405).

Sur le plan clinique, la phase terminale est marquée, tout comme chez l'homme par des manifestations cutanées, entériques et encéphaliques, des lymphomes B, perte pondérale, lympho-adénopathies et des infections opportunistes. Sur le plan biologique, on observe une hypergammaglobulinémie, une thrombocytopenie et une perte sévère des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques et des taux de récepteurs solubles d'IL-2 (375; 406). Par ailleurs, il a été noté une augmentation significative de la charge virale plasmatique, circulante et tissulaire au niveau des ganglions et de la rate (407; 408). La réponse proliférative des lymphocytes T aux

antigènes viraux diminue considérablement (404; 409; 410). Les réponses cytotoxiques spécifiques disparaissent plus ou moins rapidement selon l'animal. A côté de la forme précédemment décrite et observée chez l'homme, il existe chez les macaques nemestrina ou rhesus indien, une forme à évolution aiguë. Dans environ un tiers des cas, les singes présentent une virémie importante sans induction apparente de la réponse immunitaire anti-SIVmac et évoluent rapidement vers une forme aiguë de la maladie qui aboutit à la mort dans les trois mois qui suivent l'inoculation virale (409). Ce type d'évolution n'est pas observé chez l'homme, sauf dans certains cas de SIDA pédiatrique à transmission périnatale.

Il existe des formes prolongées et moins virulentes, avec une longue période d'incubation supérieure à celle sus-citée, c'est le cas de l'infection expérimentale du macaque à queue de cochon par SIVmac (175; 410; 411). Ils se caractérisent par une charge virale généralement inférieure à  $10^5$  copies d'ARN/ml de plasma pendant les phases post-aiguë et chronique de l'infection.

Dans le modèle d'infection SIVmac chez le macaque, l'évolution de l'infection dépend du virus inoculé et de l'animal. L'inoculum correspond soit à des souches virales isolées à partir d'animaux infectés en captivité, soit à des clones moléculaires obtenus à partir de ces isolats. Ces virus induisent ou non une maladie et lorsqu'ils l'induisent, son évolution est plus ou moins rapide selon le virus inoculé.

Par exemple, les isolats SIVmac 251 et SIVmac 239 induisent chez les macaques rhesus indien une évolution rapide vers un SIDA (167; 168). Ainsi, un tiers des animaux meurt 3 à 6 mois après l'inoculation. Trois clones moléculaires ont été obtenus à partir de l'isolat SIVmac 251. Le pouvoir pathogène diffère d'un clone à l'autre, ce qui montre bien que l'isolat est constitué d'une population virale hétérogène. Deux de ces clones (SIVmac251 & SIVmac 1A11) n'induisent apparemment pas de maladie chez le rhesus (170; 171), tandis que le troisième clone (BK28) induit occasionnellement un SIDA chez ces animaux (169).

L'introduction de délétions au niveau du gène *nef* du clone SIVmac239 a permis de montrer le caractère essentiel de ce gène dans l'induction de la maladie chez des macaques (168; 189; 195) Par une approche similaire, le rôle de certaines régions de la gp120 du SIVmac dans la lymphopénie T CD4<sup>+</sup> a été évoqué (412).

Par rapport aux infections pathogènes, la primo-infection par des virus atténués se traduit par des charges virales plasmatiques et ganglionnaires inférieures de 2 à 3 log et de 1 à 1,5 log respectivement (413). On note également une hyperplasie folliculaire rapide de centres germinatifs au niveau des ganglions qui pourrait traduire une réponse humorale précoce et expliquer le piégeage des immuns complexes par les cellules folliculaires dendritiques (380;

413). La production des  $\beta$ -chimiokines RANTES, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  par les monocytes/macrophages pulmonaires est plus importante comparativement aux animaux infectés par des souches pathogènes SIVmac251 (414). Ces résultats suggèrent une réponse immune efficace chez les macaques infectés par des virus atténués. Ce modèle expérimental a toujours été utilisé dans l'évaluation de l'utilisation de vaccins atténués [pour revues voir (415)].

### **1.5.1.2 Autres modèles d'infection chez le macaque :**

(Tableau 2)

#### **L'infection par VIH-1**

Devant les difficultés d'utilisation du modèle chimpanzé dans les approches thérapeutiques et/ou vaccinales, il apparaît nécessaire de développer d'autres modèles simiens d'infection à VIH-1. Certains auteurs ont tenté de transmettre le VIH-1 au macaque rhésus (416), ou au macaque fascicularis (417) ces tentatives d'infection de ces deux espèces de macaques (*M. mulatta*, *M. fascicularis*) se sont soldées par des échecs. Jusqu'à présent, seule l'infection persistante sans aucune pathologie, du macaque à queue de cochon (*M. nemestria leonina*) a été rapporté (143; 418). Il faut signaler cependant qu'il ne s'agit pas d'isolat primaire VIH-1. D'autres essais d'infection par des isolats primaires de VIH-1 ou par des virus clonés VIH-1(LAI) ou VIH-1(Z6) ont échoué (419).

Cependant, même si cette infection se traduit par une virémie précoce et une séroconversion, la réplication virale diminue de façon très significative dans le temps. Plusieurs passages *in vivo* effectués par la suite n'ont pas permis d'obtenir un variant pathogène (420).

L'étude de la réponse immune à médiation cellulaire chez ces animaux a montré une réponse proliférative des cellules T CD4+ aux antigènes du VIH-1, ainsi que la présence au niveau périphérique de CTL spécifiques de *gag*, *env*, et *nef*, qui persistent plusieurs années après l'infection (421). Ces réponses cellulaires, précoces et persistantes sont retrouvées au niveau des ganglions et sont corrélées au contrôle de la virémie (422).

**Tableau 2 : Modèles de SIDA chez les primates**

<b>Virus</b>	<b>Hôte naturel</b>	<b>Sida</b>	<b>Hôte expérimentale</b>	<b>Sida</b>
VIH-1	<i>Homo sapiens</i>	+	<i>P. troglodytes</i>	**
VIH-2	<i>Homo sapiens</i>	+	<i>M. nemestrina</i>	±
			<i>M. fascicularis</i>	±
			<i>P. cynocephalus</i>	±
			<i>M. mulata</i>	±
			<i>P. cynocephalus</i>	+
SIVmac		-	<i>Macaca spp.</i>	+
SIVsm	<i>C. atys</i>	-	<i>M. mulata</i>	+
			<i>M. nemestrina</i>	+
			<i>M. fascicularis</i>	+
SIVsm Pbj14			<i>M. nemestrina</i>	*
			<i>M. mulata</i>	*
			<i>C. atys</i>	*
SIVagm.ver	<i>C. aethiops</i>	-	<i>M. nemestrina</i>	±
SIVlhoest	<i>C. l'hoesti</i>	-	<i>M. nemestrina</i>	+
SIVrcm	<i>C. torquarus torquatus</i>	-	<i>M. fascicularis</i>	-

- : pas d'évolution vers un SIDA
- + : évolution vers un SIDA dans la majorité des infections
- ± : évolution vers un SIDA observé dans quelques cas
- \* : infection fatale suraiguë mais différente du SIDA
- \*\* : un seul cas de décès

## **L'infection par VIH-2**

Le VIH-2 est phylogénétiquement proche des SIVmac et SIVsm avec qui il partage environ 75% d'homologie en séquence nucléotidique. Ainsi, des tentatives de développement d'un modèle d'infection VIH-2 chez le macaque ont été entreprises.

Le macaque rhésus et le cynomolgus sont sensibles à l'infection VIH-2, toutefois celle-ci n'évolue pas toujours vers une maladie et n'est pas non plus toujours persistante (423; 424). Cependant la virulence peut être augmentée par des passages successifs chez l'animal (425; 426). L'infection par le VIH-2 a également été testée chez le macaque à queue de cochon, suggérant une sensibilité plus importante chez cette espèce (427).

Compte tenu du faible pouvoir pathogène du VIH-2 observé lors des infections réalisées chez les macaques, ce modèle a été abandonné dans les études physiopathologiques au profit des études sur l'évaluation des stratégies thérapeutiques et la préparation de vaccins pouvant induire une immunisation stérilisante.

## **L'infection par SIVsm**

Les souches, SIVsmDelta (393) et SIVsmYerkes (176) se sont révélées pathogènes chez les macaques rhésus (406).

La souche SIVsmYerkes a rendu malade aussi des macaques à queue de cochon (179) et de cette infection a été obtenue un variant nommé SIVsmPbj14. Les macaques cynomolgus et à queue de cochon se sont révélés vulnérables à l'infection suraiguë par le variant SIVsmPbj14. Par contre le macaque rhésus le serait moins et ferait un SIDA classique (428). La mort provoquée par ce variant n'est pas due à une immunodéficience, mais elle est causée par un syndrome diarrhéique gastro-intestinal suraigu. Cette souche a été démontrée pathogène pour les mangabés aussi (429).

## **L'infection par SIVagm**

L'infection de macaques par SIVagm a été tentée, mais dans la plupart des cas les macaques présentent une infection asymptomatique (182; 258; 430; 431), seule une souche bien spécifique de SIVagm.ver s'est révélée pathogène chez le macaque à queue de cochon (340). Jusqu'à présent un seul isolat SIVagm, le SIVagm9063, a été décrit comme capable



d'induire un SIDA chez le *Macaca nemestrina*. Il s'agit d'un virus isolé chez un macaque infecté par un SIVagm.sab. Cette infection pathogène se caractérise par une virémie périphérique et tissulaire précoce, une thrombocytopénie fréquente, une lymphopénie sévère, la survenue d'infections opportunistes et de méningo-encéphalites et par le décès des animaux (5/8) dans un délai d'un an après l'infection (184).

### **L'infection par SIVlhoest**

L'infection expérimentale de macaques (*Macaca nemestrina*) par le SIVlhoest a montré le potentiel pathogénique de ce virus susceptible d'induire un SIDA chez le nouvel hôte (180). Cet isolat, infecte de manière productive à la fois les lymphocytes primaires humains et celles des macaques, et peut être à l'origine de l'infection persistante chez le macaque. L'infection est caractérisée par une forte charge virale en phase aiguë, une semaine après l'infection aussi bien au niveau périphérique ( $10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml de plasma) qu'au niveau des ganglions ( $10^3$  cellules/ $10^6$  cellules). Trois semaines après l'infection, la charge virale plasmatique diminue et on note une intense hyperplasie folliculaire et un piégeage de particules virales par les cellules folliculaires dendritiques au niveau des ganglions. On observe aussi une diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4 périphériques associée à une perte pondérale et à une thrombocytopénie.

#### **1.5.1.3 Modèle d'infection chez le babouin**

Les babouins jaunes (*Papio cynocephalus*) infectés par VIH-2 constituent un modèle intéressant d'infection pathogène (432). Cette infection est persistante et, selon l'isolat VIH-2 (VIH-2 UC2) inoculé, peut évoluer vers un syndrome similaire au SIDA humain en moins de trois ans.

#### **1.5.1.4 Modèle des virus chimères**

Les SHIV (*Simian Human Immunodeficiency Virus*) sont des virus chimériques qui sont capables d'infecter les macaques et d'exprimer les protéines virales du VIH-1. Ces virus qui expriment les gènes *env*, *rev*, *vpu* et *tat* du VIH-1, en plus de la partie LTR-*gag-pol* du SIVmac, sont capables de se répliquer efficacement chez des macaques (193; 433-436). Ce type d'approche a notamment permis, entre autres, (i) de renforcer l'hypothèse selon laquelle

il y a une sélection lors de la transmission par voie sexuelle, dépendante de l'enveloppe virale des variants viraux (437), (ii) de mettre en évidence le rôle des co-récepteurs du VIH dans les événements postérieurs à l'entrée du virus dans la cellule (438; 439) et (iii) de définir le rôle de certains gènes accessoires (440-442).

Un chimère de SIVmac239, comprenant les gènes *env*, *rev* et *tat* de souches VIH-1 T-tropique et M-tropique chez le macaque rhésus a permis de mettre en évidence une charge virale systémique et ganglionnaire plus élevée avec la souche T-tropique et similaire à ce qui est observé avec le SIVmac239 (443). Cependant ces infections demeuraient asymptomatiques plus d'un an après infection.

En 1996, un SHIV s'est montré pour la première fois virulent chez des macaques à queue de cochon, en induisant une perte progressive des cellules T CD4<sup>+</sup> et aboutissant à l'apparition d'un SIDA (444). Par rapport aux précédents ce SHIV contient en plus des gènes *tat*, *rev* et *env* de VIH, le gène *vpu* et le reste SIV. De plus il ne s'est révélé pathogène qu'après plusieurs passages *in vitro* sur la moelle osseuse des animaux. D'autres SHIV se sont montrés pathogènes chez des macaques à queue de cochon (444-446) et des macaques rhésus (447) après plusieurs passages *in vivo*. L'acquisition du pouvoir pathogène n'est pas bien comprise actuellement et serait corrélée avec la modification de 12 résidus de la glycoprotéine d'enveloppe (448).

En conclusion, (i) le développement attendu de ces virus chimères est l'inclusion concomitante de gènes *pol* et *env*, de manière à développer simultanément des essais vaccinaux et thérapeutiques immédiatement transposables à l'homme, (ii) l'échange de plus en plus de matériel génétique SIV par du matériel VIH permettrait ainsi de mieux comprendre la pathogénèse lentivirale.

## **1.5.2. Modèles simiens d'infection non pathogène**

### **1.5.2.1 L'infection lentivirale du chimpanzé :**

Deux sortes d'infection sont possibles chez le chimpanzé: l'infection naturelle par SIVcpz et l'infection expérimentale par VIH-1.

## **L'infection naturelle par SIVcpz**

L'infection lentivirale naturelle a été identifiée chez deux chimpanzés (SIVcpz gab) au Gabon, au centre de primatologie du CIRMF à Franceville, une autre chez un chimpanzé originaire du Zaïre (SIVcpz ant-1) et maintenu en captivité dans un zoo en Belgique (216; 232). A ce jour six souches virales SIVcpz ont été caractérisées (SIVcpzGAB1, SIVcpzGAB2, SIVcpzANT, SIVcpzUS, SIVcpzCAM3 et SIVcpzCAM5). Un des animaux infectés par SIVcpz GAB présentait une lymphoadénopathie chronique, mais aucune anomalie biologique ni de signes cliniques d'immunodéficience n'ont pu être observés chez les autres animaux. Les isolats SIVcpz gab et SIVcpz ant-1 ont été obtenus à partir de deux de ces animaux. Ces virus se répliquent dans les PBMC humains et simiens, ainsi que dans les lignées monocytaires établies à partir d'un chimpanzé et les lignées T humaines, par contre ils n'induisent pas d'effet cytopathogène *in vitro* (232). Chez un animal infecté par SIVcpz-ant, tous les isolats viraux obtenus sur une période de cinq ans sont du phénotype NSI (449). La charge virale, mesurée par le nombre de particules virales infectieuses circulantes chez cet animal, est faible et très variable dans le temps. Selon certains auteurs, cette variabilité pourrait refléter l'échappement viral consécutif au développement d'anticorps neutralisants (449), cependant cet argument reste très spéculatif. Par contre, on note dans le cas de l'infection des chimpanzés par VIH-1, une hyperplasie folliculaire, une infiltration de cellules CD8<sup>+</sup> au niveau des centres germinatifs et une absence de piégeage de particules virales (450).

## **L'infection expérimentale par VIH-1**

Les analyses génétiques ont montré que le SIVcpz est proche du VIH-1, avec 84% d'homologie au niveau du gène *pol*, alors que les autres SIV connus ne partagent pas plus de 60% d'homologie avec VIH-1 (9).

L'infection VIH-1 chez le chimpanzé, comme l'infection naturelle par SIVcpz, ne provoque pas de signes cliniques de l'immunodéficience (451; 452). Alors que plus de 150 chimpanzés ont été infectés par VIH-1 depuis une dizaine d'années, deux seulement ont évolué vers la maladie (166; 453; 454).

Les mécanismes associés à la non pathogénicité du VIH-1 chez les chimpanzés sont encore mal connus.

Comparativement aux paramètres biologiques observés chez l'homme, les chimpanzés exposés au VIH-1 développent un pic de virémie initial de courte durée, suivi d'une

décroissance concomitante de l'apparition d'une large réponse immune humorale spécifique (455-457). Après cette phase aiguë de primo-infection, la charge virale ayant diminué au niveau périphérique, elle est plus élevée au niveau des ganglions que dans les PBMC (451; 458). L'évolution de la charge virale apparaît donc similaire à celle observée lors de l'infection humaine. Contrairement à celle-ci, elle reste cependant constante et n'augmente pas au cours de l'infection. Plusieurs passages *in vivo* effectués par la suite n'ont pas donné de variants pathogènes (420).

Par ailleurs, les chimpanzés infectés par le VIH-1 développent également une réponse immune à médiation cellulaire en réponse à l'antigène (416; 459; 460) ainsi qu'une activité cytotoxique restreinte par le CMH (165). Comme chez l'homme, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> des animaux infectés sont capables de sécréter un facteur suppresseur de la réplication virale (165; 461).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants des chimpanzés infectés depuis cinq ans par le VIH-1/LAI, ne meurent pas à un taux anormal par apoptose après activation *in vitro* (405; 462).

Pendant la phase chronique de l'infection, le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> reste constant. Et, les charges virales périphérique et tissulaire sont faibles mais avec une différence marquée étant donné qu'on trouve dix fois plus de provirus dans les ganglions que dans les PBMC (451; 458). Contrairement à ce qui est décrit chez l'homme, un très faible nombre de particules virales et de cellules productrices de virus a été retrouvé dans les centres germinatifs ganglionnaires (450). Aucun signe d'hyperactivation chronique du système immunitaire n'est décelable chez ces animaux (463), l'histologie des ganglions est normale, avec des follicules de taille limitée, et un taux normal d'apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques est observé après stimulation *in vitro* (464). Il faut toutefois noter que chez les animaux pour lesquels une baisse du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a été notée, celle-ci s'accompagne d'une augmentation du taux d'apoptose des lymphocytes périphériques (465).

Au niveau ganglionnaire, une infiltration de cellules T CD8<sup>+</sup> dans les centres germinatifs peut être observée chez certains animaux, cependant ces cellules n'expriment pas le granzyme B qui est un marqueur des cellules cytotoxiques (450). Selon certains auteurs, l'absence de CTL dans les centres germinatifs pourrait expliquer la préservation de l'architecture des ganglions et la non-progression vers la maladie.

Plusieurs autres facteurs qui pourraient être responsables de la non pathogénicité du VIH-1 chez le chimpanzé ont été évoqués, mais leur implication réelle reste hypothétique d'autant plus que les observations qui les sous-tendent peuvent être spécifiques des souches

virales utilisées. Parmi ces hypothèses, on peut citer: (i) l'absence de virus dans les macrophages/monocytes (466). Seulement, l'infection des macrophages a bien lieu avec la souche virale LAV-1b (467), (ii) l'absence d'une transmission du virus de cellule à cellule (468); et (iii) l'absence d'une activité CTL contre les cellules CD4<sup>+</sup> non infectées, contrairement à ce qui a été décrit chez l'homme (469).

L'infection des chimpanzés par le VIH-1 est un modèle qui a surtout été utilisé pour l'évaluation de l'efficacité de candidats-vaccins pouvant protéger contre le VIH (470; 471).

Cependant, l'utilisation de ce modèle est limitée aux essais vaccinaux à cause du faible nombre d'animaux disponibles et du fait de la protection de l'espèce, d'autre part, au nombre limité d'isolats primaires VIH-1 capables de se multiplier chez cet animal. L'utilisation d'animaux plus petits et non protégés reste donc un sujet d'actualité.

### **1.5.2.2 L'infection lentivirale des singes verts**

L'infection des singes verts par SIVagm est persistante et asymptomatique comme chez les autres porteurs naturels de SIV (7; 210; 220; 222; 256; 452). Cette infection est endémique chez les populations sauvages de singes verts avec des taux de séroprévalence compris entre 30 et 50% (7; 156; 226; 472).

La majorité des souches SIVagm inoculées aux macaques par voie intra-veineuse ne sont pas pathogènes, à l'exception d'une seule qui a provoqué un syndrome d'immunodéficience (340).

La primo-infection chez le singe vert est comparable à celle observée chez le modèle pathogène. En effet, une seule expérimentation a été réalisée jusqu'à présent, la primo-infection chez le rhesus (68) et a montré qu'au niveau périphérique, le plus grand nombre de copies d'ADN viral (entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>5</sup> copies pour 1 million de cellules) a été observé 10 jours après l'infection chez trois des quatre animaux inoculés avec des cellules et du plasma infectés. Pour le quatrième animal le pic a été observé dès le 7<sup>ème</sup> jour après l'infection. La charge virale ARN plasmatique était maximale entre J7 et J14 avec des valeurs comprises entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>7</sup> copies par ml de plasma. Au niveau des ganglions, il a été observé que les pics de charge virale ADN et ARN étaient également observés entre le 7<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour après l'infection, avec des valeurs un peu plus faibles (entre 10<sup>3</sup> et 10<sup>4</sup> copies d'ADN, et 3.10<sup>3</sup> et 3.10<sup>4</sup> copies d'ARN pour 1 million de cellules). Au bout de 14 à 21 jours après l'infection, les charges virales ADN baissent de 2 à 3 log dans les deux compartiments et atteignent les valeurs observées pendant la phase chronique de l'infection, à savoir entre 10<sup>2</sup>

et  $10^3$  copies d'ADN viral pour 1 million de cellules. De même, les charges virales ARN diminuent de 1 à 4 log en périphérie pour atteindre des valeurs comprises entre 10 et  $2.10^3$  copies par ml de plasma. Après les pics de charge virale, la décroissance est de 1 à 2 log avant J21, puis de même amplitude jusqu'à trois mois après l'infection. Par ailleurs les ganglions durant la primo-infection ne subissent aucun changement morphologique majeur et ne présentent ni hyperplasie folliculaire ni infiltration de cellules  $CD8^+$  dans les centres germinatifs (68).

Des études montrent l'infection des organes lymphoïdes qui conservent cependant une architecture normale et la charge virale ganglionnaire a été évaluée à une cellule infectée pour  $10^4$  cellules (473). En dépit du tropisme préférentiel du SIVagm.sab pour les lymphocytes T  $CD4^+$  simiens, les singes verts ne développent pas de lymphopénie T  $CD4^+$  (474). L'infection des vervets par SIVagm.ver a montré au cours de la primo-infection, un déclin transitoire des cellules  $CD3^+CD4^+$  dans le sang des animaux dont la charge virale était élevée, accompagné de signes d'activation transitoire des cellules  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  aussi bien dans le sang, qu'au niveau des ganglions entre J7 et J17 (autour du pic de virémie) après infection. Ces résultats suggèrent une absence d'augmentation de l'activation cellulaire durant la phase chronique car faible pendant la phase aiguë, et contrastant avec les observations faites dans l'infection lentivirale pathogène (475).

Les singes verts infectés développent une réponse immune humorale dirigée contre le virus. Cependant la réponse en anticorps dirigée contre la protéine majeure core (p26) est faible voire absente chez ces animaux (222; 452; 476), et cette caractéristique est partagée par d'autres hôtes naturels de virus SIV tels que les mandrills (229) et les mangabés (187), contrairement à ce qui est observé chez l'homme.

Par contre, le macaque à queue de cochon et les babouins infectés par SIVagm développent une très forte réponse humorale anti-p26 (258; 260; 383). La signification de cette faible réponse humorale, contre la protéine p26 du SIVagm chez l'hôte naturel, n'est pas connue.

Les vervets infectés par SIVagm, développent également des anticorps neutralisants, mais le titre apparaît faible (477). Cette neutralisation devient plus sensible après exposition à des molécules  $CD4$  solubles (478) et cet effet est supprimé en présence d'anticorps obtenus chez des animaux naturellement infectés (478; 479). La description d'anticorps, produits pendant la phase précoce de l'infection, capables de neutraliser le virus après son attachement à la molécule  $CD4$  (480) est en faveur d'un changement conformationnel de la gp120 consécutif à son interaction avec la molécule  $CD4$ . Comme chez l'homme il semblerait que

les singes verts infectés ne développent pas non plus d'anticorps cytotoxiques capables d'induire la lyse des cellules infectées en présence de complément (476). L'activité ADCC, ainsi que l'activité cytotoxique non restreinte par le CMH, est inférieure à celle retrouvée chez l'homme infecté par le VIH-1 et le macaque rhésus infecté par le SIVmac (481). L'activité CTL est probablement faible pendant la phase chronique de l'infection (482).

Par ailleurs, les monocytes/macrophages sont sensibles à l'infection SIVagm (478; 483) de même que les lignées cellulaires T humaines comme les Molt-4 clone 8, les C8166, les CEM et les SupT1 *in vitro* (7; 452; 476). Par ailleurs, Le SIVagm a la capacité d'utiliser, en plus de la molécule CD4 (474; 478), au moins trois co-récepteurs CCR5, STRL33 et gpr15 pour rentrer dans la cellule (130; 135). Enfin, aucune induction d'apoptose n'a été mise en évidence après activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *in vitro* (405).

En outre, la charge virale apparaît faible chez les vervets infectés naturellement, 0,5 à 5 copies d'ADN proviral pour 10<sup>6</sup> PBMC circulants (484), mais des variations individuelles sont observées. La mise en cause de l'absence de pathogénicité dû à la faible réplication du SIVagm chez son hôte naturel est très controversée (474; 485; 486). D'autres facteurs pourraient expliquer l'absence de pathogénicité, par exemple les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de vervets sécrètent un facteur soluble capable d'inhiber la réplication du SIVagm *in vitro*. Cependant la présence de ce facteur n'explique pas à lui tout seul l'infection asymptomatique chez le singe vert, puisqu'un facteur similaire est décrit chez l'homme infecté par le VIH-1 (474; 487-489).

Des études récentes ont démontré que le niveau de virémie, plasmatique et tissulaire, au cours de la phase aiguë et chez les singes verts naturellement infectés était comparable à celle observé dans le modèle pathogène (490; 491). Par ailleurs, le contrôle de cette virémie au cours de la primo-infection n'est pas la raison de la résistance de l'hôte à la progression de la maladie (188).

L'histoire naturelle de l'infection SIVagm chez le singe vert reste mal connu, des événements associés tant à la primo infection, qu'en phase chronique par le suivi des paramètres virologiques, biologiques et immunologiques au niveau périphérique et tissulaire méritent d'être explorés davantage.

### **1.5.2.3 Modèle d'infection chez le mangabey**

Les sooty mangabey sont porteurs asymptomatiques de SIVsm (157; 176; 218). Toutefois ils développent une maladie fulgurante après inoculation de SIVsmPbj14, un

variant hautement pathogène sélectionné par passage au macaque (178). Par contre, deux mangabés naturellement infectés par SIVsm se sont révélés résistants à la surinfection par ce variant hyperpathogène (179).

Le sooty mangabey naturellement infecté ne développe pas de SIDA en dépit d'une charge virale élevée ( $10^5$  à  $10^7$  copies d'ARN/ml) et d'une circulation de cellules T lymphocytotoxiques (CTL) spécifique de SIV (187) indétectable. L'on note aussi pendant la phase chronique que, malgré une réplication élevée constatée par le fort taux de mutation, l'infection demeure non pathogène (187). Ces auteurs montrent que la charge virale ADN et ganglionnaire varie entre  $2.10^3$  et  $6.10^3$  copies/ $10^6$  cellules au niveau périphérique, et entre  $5.10^3$  et  $2.10^4$  copies/ $10^6$  cellules au niveau ganglionnaire. La charge virale plasmatique, entre  $10^5$  et  $10^7$  copies d'ARN/ml de plasma est aussi élevée que celle décrite chez des macaques infectés par un SIVmac pathogène. Ces résultats fragilisent un tant soit peu la forte association constatée jusqu'à présent entre une charge virale élevée et la progression vers la maladie. La cytopathogénicité du SIVsm est moins importante pour les cellules de mangabés que pour les cellules de macaques, alors que d'autres ne décèlent pas de différence (492; 493). Des études virologiques ont montré chez le mangabé une prédominance de formes virales avec des séquences *nef* différentes de celles retrouvées chez le macaque (494). Du point de vue immunologique, des réponses lymphoprolifératives à l'antigène normales, ainsi que des anticorps dirigés contre le virus, même s'ils ne sont pas neutralisants, ont été décrites (157; 495). Ces données témoignent d'une réponse humorale et cellulaire active ainsi qu'une absence d'induction de phénomènes de tolérance, au sens strict, du SIVsm par son hôte naturel. Avec l'âge, il a été observé une chute des  $CD4^+$ , associée à une baisse de la charge virale (496). Comme cela a été décrit chez le macaque et le singe vert, les cellules  $CD8^+$  du mangabé sécrètent également un facteur soluble suppresseur de la réplication virale *in vitro* (497). Cependant l'effet de ce facteur semble moins important chez le mangabé, puisque l'isolement du virus pendant la phase asymptomatique, sans déplétion des cellules  $CD8^+$ , est plus facile que chez le macaque (157; 497) bien que la charge virale soit élevée dans les deux cas. Enfin aucune différence n'a été notée entre les activités NK chez les mangabés infectés et non infectés (498).

### **1.5.3 . Autres exemples d'infection lentivirale naturelle des primates non humains**

Des exemples d'infection naturelle non pathogène jusqu'à ce jour ont été identifiés; le mandrill (229), le cercopithèque à diadème (164), le talapoin (499), le mangabé à crête rouge



(14), des drills (271), singes De Brazza (11), singes Mona (11), le Cercopithèque wolfi (12) et le Cercopithèque ascanius(12).

Ces animaux ne semblent pas développer la maladie malgré l'infection virale persistante. Les premières données sur le mandrill et le cercopithèque diadème indiquent qu'ils présentent une faible réponse humorale dirigée contre la protéine majeure du core p25 (7), comme cela fut observé pour le singe vert. De même, très peu d'informations sont disponibles sur l'infection naturelle du cercopithèque l'hoesti par le SIVlhoest, des mangabés à crête rouge par le SIVrcm, des drills par le SIVdrl, singes De Brazza par SIVdeb, singes Mona par SIVmona, Cercopithèque wolfi par SIVwol et cercopithèque ascanius par SIVasc.

Contrairement au SIVsyk, le SIVlhoest et le SIVrcm sont capables d'infecter de manière productive des CMSP humains et des macaques. Une des particularités biologiques du SIVrcm par rapport aux virus des autres espèces de mangabé est son incapacité à infecter la lignée cellulaire CEMx174, ce qui traduit probablement une différence dans l'utilisation des co-récepteurs. L'isolat SIVrcm95GB1 semble présenter un profil unique parmi les VIH/SIV de par sa capacité à utiliser le co-récepteur CCR2b et non-CCR5 (500).

Aucune pathologie n'a pu être reliée aux SIV chez leurs hôtes naturels respectifs, alors qu'ils peuvent induire un SIDA chez des espèces hétérologue. Ces modèles non pathogènes sont d'un grand intérêt pour l'étude des facteurs impliqués dans la résistance à la maladie. Et, pour le moment sont aussi informatifs que les SHIV non pathogènes.

## **2. Les mécanismes influençant la pathogenèse du SIDA**

Le SIDA est caractérisé par la chute des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> [pour revue, voir (276; 501)]. Paradoxalement, l'état d'immunodépression se développe et s'aggrave progressivement bien que des réponses humorales et cellulaires dirigées contre la plupart des antigènes viraux, soient présentes au début de l'infection. De nombreuses études entreprises ces dernières années, dans le but de mieux comprendre les mécanismes directs et indirects induits par des lentivirus pathogènes ou non pathogènes qui ont permis une amélioration considérable des connaissances sur la physiopathologie des infections par le VIH et le SIV.

## **2. 1. La physiopathologie de l'infection pathogène à VIH ou SIV**

### **2.1.1. Dissémination du virus et infection précoce**

La transmission sexuelle du VIH constitue une des voies majeures de l'entrée du VIH dans l'organisme (502; 503). Elle se fait principalement *via* l'interaction entre les cellules cibles résidentes de la muqueuse et les cellules infectantes, dont le nombre est en général largement supérieur à celui des particules virales libres dans les sécrétions génitales des individus infectés. Le franchissement de la barrière muqueuse peut être facilitée par des lésions dues par exemple à d'autres agents sexuellement transmissibles (504; 505). Parmi ces cellules, les cellules de Langerhans semblent jouer un rôle majeur (506).

La dissémination du SIV est rapide suivant l'exposition des sujets par voie rectale, intraveineuse ou vaginale. Et quelque soit le tropisme du virus et la voie de transmission, les cellules T demeurent la cible principale du virus (381; 507; 508).

Les cellules dendritiques infectées migreraient par la suite vers les organes lymphoïdes les plus proches permettant ainsi la transmission du virus aux cellules T CD4<sup>+</sup> (381; 505; 509). Plusieurs arguments sont en faveur d'une transmission préférentielle de virus VIH à tropisme R5 pendant les phases précoces de l'infection (510), tout comme chez le SIV (116; 135). En effet, d'une part les cellules de Langerhans expriment seulement le co-récepteur CCR5 et non le co-récepteur CXCR4 (511). D'autre part, même si ces cellules ont la capacité de fixer des virus X4 et R5 par un mécanisme indépendant à la fois de CD4 et du co-récepteur (512), seule la protéine d'enveloppe des virus R5 possède la propriété d'activer et de recruter les cellules T CD4<sup>+</sup> par chimiotactisme (513).

D'autres hypothèses pouvant rendre compte de la prédominance des virus R5 pendant la phase précoce de l'infection par voie sexuelle ont été avancées. Il s'agit d'une part de l'élimination préférentielle de virus X4 et de la faible expression du co-récepteur CXCR4 par les premières cellules cibles comme les cellules muqueuses de l'intestin et du col de l'utérus (514; 515). D'autre part, il est également possible que le virus s'établisse dans les compartiments cellulaires qui possèdent de forts taux de chimiokines capables de bloquer le co-récepteur CXCR4. Cependant, aucune de ces hypothèses ne permet d'expliquer la faible fréquence de transmission des virus R5X4 qui sont pourtant capables d'utiliser le co-récepteur CCR5. Les organes lymphoïdes qui sont les cibles précoces du VIH constituent un réservoir important de virus dès les premières phases de l'infection (516; 517), notamment à cause de la présence de particules virales piégées par les cellules folliculaires dendritiques (518) aussi

bien chez l'homme que chez le singe (cf. chapitre 1.5). Tout au long de l'infection, on note une dégradation progressive de l'architecture ganglionnaire probablement due à la lyse des cellules folliculaires dendritiques par les cellules T CD8<sup>+</sup> infiltrées dans les centres germinatifs (317; 519; 520). Cependant il n'existe pas d'arguments définitifs permettant de déterminer si la destruction de ces tissus lymphoïdes est la cause ou la conséquence des dysfonctionnements du système immunitaire.

### 2.1.2. Déplétion en cellules T CD4<sup>+</sup>

Les réponses immunes sont initiées très tôt après l'infection dans les organes lymphoïdes, ils sont à l'origine du contrôle précoce par les effecteurs cellulaires et humoraux dirigées contre les différents antigènes du VIH. Ces réponses ne permettent pas d'éradiquer le virus qui se maintient notamment au niveau des cellules présentatrices d'antigène à partir desquelles ils se disséminerait dans l'organisme (521; 522). Il faut signaler qu'une intense recirculation des cellules immunocompétentes à lieu au niveau des organes lymphoïdes. Leur atteinte par le VIH pourrait par conséquent être responsable de l'activation chronique des cellules lymphoïdes immunocompétentes favorisant notamment leur infection, la réplication virale et la destruction des cellules infectées. Ce processus dynamique aboutirait à la limitation des capacités de régénération centrale (thymus) ou périphérique (organes lymphoïdes secondaires) des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (523; 524). Des études récentes ont montré la présence de particules virales dans le thymus (525) ainsi qu'une altération du renouvellement des lymphocytes T, surtout les cellules naïves, chez les individus infectés par le VIH-1 (526-528). Cette altération, qui se traduit également au niveau qualitatif avec la perturbation du répertoire des lymphocytes T (529), pourrait participer de l'arrêt de la différenciation des thymocytes (530). La régénération des cellules T naïves chez des patients traités avec des associations d'antirétroviraux (531-533) est un argument fort en faveur de l'atteinte thymique lors de l'infection par le VIH.

L'action cytopathgène du virus ne peut expliquer à elle seule ni la destruction des cellules T CD4<sup>+</sup>, ni les altérations fonctionnelles du système immunitaire, étant donné le nombre relativement faible des cellules infectées qui répliquent le virus (534-536). Il y a une évidence certaine, soutenue par les changements au niveau du sang périphérique des populations lymphocytaires T, qui résultent largement des changements de distribution des lymphocytes (537). Des études ont aussi montré qu'il y a une augmentation dans le *turnover* des deux sous populations T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> dans l'infection SIV pathogène ou non (402;

403; 538). Outre la destruction des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés par les CTL [pour revue voir (539)], d'autres mécanismes physiopathologiques ont été proposés afin de rendre compte de la sévère lymphopénie terminale :

- Les cellules non infectées peuvent fixer la gp 120 sur leurs récepteurs CD4 et être détruites par des mécanismes accessoires de cytotoxicité (540; 541),

- l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés à une stimulation antigénique chronique peut conduire soit à l'anergie (459; 542), soit à la mort cellulaire par apoptose des cellules infectées et non infectées (543-546), enfin, l'activation inadéquate des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par des cellules présentatrices de l'antigène dont la fonction serait affectée, par l'infection à VIH par exemple, pourrait également conduire soit à l'anergie, soit à la mort cellulaire (547),

SIV Nef, un mutant du SIVmac239, a permis de montrer le rôle de la protéine Nef dans l'apoptose. Cette protéine a été montrée comme essentielle dans la régulation de l'expression de Fas ligand, et ceci a été proposé comme mécanisme possible d'échappement du virus au système immunitaire et d'induction de l'apoptose (546; 548).

## **2. 2 Le rôle des facteurs viraux**

Plusieurs études ont permis de montrer qu'il existe une corrélation étroite entre la charge virale et la progression vers la maladie des individus infectés par le VIH. Certaines caractéristiques du virus comme le pouvoir répliatif, la grande variabilité, et le tropisme du virus concourent à l'établissement de cette charge virale.

### **2. 2.1 Variations génétiques et échappement à la réponse immune**

La capacité du VIH à générer et à accumuler des mutations lors de son cycle répliatif joue très certainement un rôle majeur dans l'échappement, aux réponses immunes humorale et cellulaire, observées pendant les phases précoce et chronique de l'infection (549; 550). Cependant la prédominance de virus à fort pouvoir répliatif en phase SIDA n'est pas la cause de l'immunodéficience terminale mais plutôt une conséquence de celle-ci. En effet de tels virus sont présents pendant la phase de primo-infection sans pour autant conduire à la destruction du système immunitaire (551).

L'hypothèse d'une relation causale directe entre l'apparition de variants plus virulents ou plus aptes à échapper à la réponse immune (32; 552) et la progression vers la maladie a été proposée. Le domaine V3 hyper-variable de la gp120 du VIH, constitue l'épitope dominant de

neutralisation par les anticorps neutralisants, les boucles V3 conservée et V4 hyper variable de la glycoprotéine d'enveloppe des SIV représentent des zones sensibles aux anticorps neutralisants (553-556). La variabilité de ces régions peut permettre au virus d'échapper totalement à la réponse des anticorps neutralisants. Des mutants échappant aux réponses CTL ont été retrouvés chez des macaques infectés par SIV (557), comme dans l'infection à VIH, suggérant de multiples mécanismes pouvant contribuer à l'échappement du virus à la réponse immune de l'hôte.

Par ailleurs, compte tenu d'arguments cliniques et épidémiologiques, il a été établi un lien de causalité entre la progression vers la maladie chez des individus infectés et les différents sous types de VIH (558). Cependant, les différentes tentatives pour établir une corrélation entre le sous-type génétique et certaines caractéristiques biologiques ont abouti le plus souvent à des résultats contradictoires. Par exemple, si certains auteurs ont trouvé une différence en ce qui concerne l'infectabilité de cellules de Langerhans par différents sous-types génétiques du VIH (506; 559; 560), d'autres études montrent que cette différence était plutôt dépendante du phénotype des souches virales (561; 562). En fait, il semblerait que les différences dans la pathogénicité seraient plutôt le reflet des caractéristiques virologiques des différentes souches quel que soit le sous-type génétique auquel elles appartiennent.

## **2. 2.2 Rôle des déterminants viraux génétiques dans la pathogénèse**

Le génome du SIV, comme les autres lentivirus contiennent des gènes qui ne sont pas essentiels pour la réplication du virus dans les lignées cellulaires en culture. Pour SIV, ces gènes sont : *vif*, *vpr*, *vpx* et *nef* ont été liés à l'association des protéines des virions (563). Ni le *vpx*, ni le *vpr* ne sont essentiels seul à l'induction d'une maladie par la souche T-tropique SIVmac239 (564-566), car il a été montré quel que soit la délétion opérée sur l'un ou l'autre des gènes que le résultat est un haut degré d'atténuation de SIVmac239 (565).

En outre, la délétion du *vpx* entraîne une dramatique atténuation de la pathogénicité des souches SIVsmm M-tropique PBJ14 (508). Les déterminants viraux de la pathogénicité peuvent ne pas seulement résider dans les protéines codant les régions pour les régions du génome viral, mais aussi dans les éléments de régulation du virus. Les LTR du SIVmac239 contiennent des éléments transcriptionnels de régulation incluant une TATA box, quatre sites d'attache Sp1, un site d'attache NF- $\kappa$ B, aussi bien qu'un élément additionnel en amont non présent chez VIH-1. Tous ces éléments ont été trouvés indispensables pour la réplication du

virus dans les PBMC (567), les mutants SIVmac239 manquant de sites Sp1 et de NF- $\kappa$ B peuvent causer une maladie d'immunodéficience chez les rhesus macaques.

L'importance de Nef dans la pathogénèse de l'infection SIV a été apparente depuis que Kestler *et al.*, (168) ont montré que les macaques infectés avec un virus mutant SIVmac239 délété en *nef* restaient indemnes de la maladie et maintenaient une importante réduction de la charge virale. En plus, VIH-1 et SIV $\Delta$ Nef sont fonctionnellement interchangeables dans le contexte de virus chimériques, quand ils sont évalués pour leur habilité à accroître l'infectivité et la cinétique de réplication de tels virus dans la culture des PBMC humains et de macaques (568). Les activités qu'exerce cette protéine sont nombreuses et différentes dans les cellules infectées (569).

Les fonctions conservées de VIH-1 et SIV $\Delta$ Nef incluent la capacité d'accroître l'infectivité des particules virales, de l'altération des évènements d'activation des lymphocytes (570; 571) et de la diminution de l'expression des CD4 à la surface des cellules T infectées (571-574). Des résultats récents suggèrent que VIH-1 et SIV $\Delta$ Nef peuvent promouvoir l'internalisation des CD4 tout au moins en partie à travers une interaction spécifique avec un complexe protéine adaptatrice (AP) impliqué dans la reconnaissance d'une protéine triant les signaux (575-577). La protéine Vpu contribuerait également à la dégradation de la molécule CD4 (578).

Comme pour la molécule CD4, mais de manière moins efficace, la protéine Nef est également capable de diminuer l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I à la surface des cellules, de façon à ce qu'il ne peut pas dépendre de son interaction avec l'AP complexe (576; 579; 580). Cependant, l'intérêt *in vivo* de cette découverte de la pathogénèse virale n'est pas clair, quoique VIH-1 Nef en médiant la diminution de l'expression du CMH protège les cellules contre la lyse des CTL *in vitro* (581). Une activité similaire a été également décrite pour la protéine Tat (582). Ces deux protéines pourraient être bénéfiques à la réplication virale, surtout pendant les phases précoces de l'infection lorsqu'elles sont fortement exprimées.

En plus des activités précédemment décrites, VIH-1 et SIV $\Delta$ Nef inhibent les voies d'activation des cellules T (571; 583-588) mais il faut souligner qu'il n'y a aucun consensus à ce sujet à l'heure actuelle, car certaines expériences ont suggéré au contraire que Nef activait les cellules T (570; 589-594). Toutefois, il semble établi que les différentes activités de cette protéine concourent à augmenter la réplication virale et la pathogénicité du VIH-1 *in vivo*. En

effet il a été montré que les individus infectés par des variants VIH-1, pour lesquels le gène nef est altéré, ne progressent pas vers la maladie (325; 326).

L'étude des mécanismes de la destruction des lymphocytes a permis la mise en évidence du rôle de certaines protéines virales dans l'apoptose (595-597). Par exemple, la gp120, mais également Tat, pourraient contribuer à la destruction des cellules non infectées en augmentant l'expression AP-1 (598) à la surface des cellules infectées.

## **2. 3 Le rôle des facteurs de l'hôte**

Des études ont permis, au vu de l'observation de profils d'évolution différents chez des individus infectés par le même virus, de plaider en faveur du rôle des facteurs de l'hôte dans la pathogénèse du SIDA (328). Les études effectuées sur des patients ALT ont permis d'identifier des facteurs génétiques et immunologiques qui influencent le cours de la maladie.

### **2. 3.1 Les réponses immunes humorales et cellulaires**

Les différences qualitatives dans la réponse immune chez les individus infectés pourraient être associées à la progression plus ou moins rapide vers la maladie (599).

#### **2. 3.1.1 Les réponses humorales**

L'infection par le VIH se traduit par l'apparition d'anticorps systémiques dirigés contre les protéines de structures du virus. L'activité neutralisante des anticorps n'est pas liée au contrôle précoce de la charge virale (297). En effet, la plupart des études ont démontré que les anticorps neutralisants ne sont détectés qu'à partir du déclin initial de l'ARN plasmatique du VIH (294-296; 600). En plus, les anticorps non neutralisants peuvent être importants dans la séquestration des complexes antigènes-anticorps à l'intérieure des tissus lymphoïdes fixés. Finalement, l'immunité humorale peut avoir un rôle limité dans la rétention du VIH durant la primo-infection tandis qu'elle est encore importante pour le contrôle à long terme de la réplication virale pendant la phase chronique (296; 299). Cependant les propriétés neutralisantes des anticorps sont à ce jour mal caractérisées et leur rôle dans la protection contre l'infection est controversé. De même, les mécanismes responsables de l'apparition relativement tardive de ces anticorps ne sont toujours pas élucidés.

Les anticorps spécifiques du VIH peuvent également jouer un rôle dans la pathogenèse en facilitant la pénétration du VIH dans les cellules par l'intermédiaire soit des récepteurs Fc des Ig (601), soit du récepteur du complément (602). Ces récepteurs permettraient la fixation des complexes immuns circulants à la surface des cellules et participeraient ainsi à leur infection. Cependant, d'autres auteurs décrivent une absence de lien entre la présence de ces anticorps et la progression vers la maladie (603).

### **2. 3.1.2 Les réponses cellulaires**

Les réponses des lymphocytes CD8+ jouent un rôle majeur de défense de l'hôte contre l'infection. Ils possèdent de deux fonctions majeures, l'une cytotoxique et l'autre suppressive de la réplication virale.

#### **2. 3.1.2.1 Les différences quantitatives des sous populations lymphocytaires chez les primates**

Il est important de noter que différents primates ont des substantielles différences sur le plan quantitatif des sous populations lymphocytaires dans le sang périphérique. Les valeurs normales en nombre absolu des cellules CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, et CD8<sup>+</sup> circulant sont plus élevées chez les chimpanzés (604) et les sooty mangabey (495) que chez les humains (345; 605) et les macaques (604). Les chimpanzés, les singes verts et les sooty mangabey (184; 409; 606) ont aussi un très haut pourcentage de CD8<sup>+</sup> circulant et des ratio CD4/CD8 plus bas que les humains et les macaques rhésus (345; 604; 605; 607). Il est intéressant de remarquer qu'un très grand nombre de cellules CD8<sup>+</sup> dans le sang périphérique pourrait refléter les différentes proportions de cellules CD8<sup>+</sup> qui peuvent jouer un rôle protecteur contre le développement de la maladie par divers mécanismes tels que les cellules T et ou la cytotoxicité médié par les NK ou par la sécrétion de facteurs solubles inhibant le VIH. Toutefois, quelques espèces de macaques (macaque à queue de cochon et le macaque fascicularis) malgré un pourcentage de cellules CD8<sup>+</sup> relativement élevé, ont encore été trouvées susceptible à la maladie lentivirale (184). Ces possibles différences des fonctions des sous population de CD8<sup>+</sup> chez les primates et leur influence sur le cours de l'infection lentivirale reste à évaluer.

#### **2. 3.1.2.2 Les réponses CTL**

Il a été postulé que les CTL spécifiques du VIH peuvent être importants dans la prévention de l'infection des sujets humains à risque pour VIH [les bébés infectés par voie



verticale (608; 609), partenaires des patients infectés (610), et les prostituées dans les zones à haut risque (611)]. De même, les CTL spécifiques des lentivirus ont été suggérés jouer un rôle dans la prévention de l'infection chez les macaques (612; 613). En plus, quand la protection n'est pas efficace, les CTL spécifiques des lentivirus peuvent aussi limiter la virémie initiale. Dans une étude avec le singe cynomolgus, une corrélation inverse a été trouvée entre la fréquence des CTL précurseurs spécifiques d'une vaccine contenant nef et la charge virale après l'épreuve (614). Une corrélation inverse similaire a été trouvée entre une augmentation de la charge virale et les CTL spécifiques des lentivirus en primo-infection chez les macaques rhésus (395; 615-617) et chez les humains (293; 618).

Ces réponses sont très précoces et jouent un rôle important dans le contrôle de la réplication et de la dissémination du virus, au moins pendant les premières phases de l'infection (619; 620). Il a été clairement établi que le niveau de la charge virale plasmatique est inversement corrélé au pourcentage des CTL dirigés contre le VIH (621). Il a été montré de toute évidence que la limitation de la charge virale, en primo-infection aussi bien que dans les autres stades de l'infection lentivirale, est importante dans l'évolution de la maladie, pour le pronostic et la survie (321; 351; 613; 617; 622; 623). Par ailleurs, on note au début de l'infection une fréquence importante des précurseurs CTL de spécificité différentes puis une évolution variable qui est corrélée avec le profil d'évolution clinique vers la maladie, par exemple le maintien des CTL est souvent associé à une absence de progression vers la maladie (624; 625). Chez les sujets infectés, les CTL spécifiques de VIH et leurs précurseurs ont été détectés facilement dans les PBMCs fraîchement isolés sans re-stimulation *in vitro* (626-629). Dans les PBMCs stimulés des macaques, des CTL spécifiques de SIV ont également été retrouvés (614; 617; 622; 630-633). Cependant, l'activité CTL spécifique des lentivirus des chimpanzés et des singes verts semblent difficiles à démontrer (634; 635). Cette activité CTL a été détectée chez des chimpanzés infectés chroniquement par HIV. La non détection des CTL spécifiques dans l'infection naturelle peut être due ;(i) à des problèmes techniques (636), (ii) mais aussi à un faible nombre de CTL circulants pendant une courte période de temps.

L'efficacité du contrôle de l'infection est fortement dépendante de la spécificité et de la diversité des réponses CTL. Le maintien des CTL qui sont spécifiques du gène *gag* (624; 637) ainsi que l'hétérogénéité du répertoire V $\beta$  exprimé après les CTL pendant la primo-infection (599) semblent particulièrement impliqués dans la diminution du risque de progression vers la maladie.

Aussi, des mutations au niveau des épitopes viraux reconnus par les CTL peuvent être à l'origine de variants viraux contre lesquels la réponse CTL devient inefficace et qui se répliquent activement et influent sur la progression vers la maladie (549; 550; 638). Cependant, l'émergence de nouveaux variants peut induire de nouvelles réponses CTL adaptées et capables de les contrôler. La capacité des individus à générer des réponses CTL variées serait ainsi associée à une non progression vers la maladie (639; 640) tandis que des réponses limitées favoriseraient la progression vers la maladie (641; 642). Il faut signaler que l'activation chronique des CTL pourrait également être à l'origine de leur anergie dans les phases tardives de l'infection.

### **2. 3.1.2 3.Cytokines et réplication des lentivirus**

D'autres activités anti-virales des CD8<sup>+</sup> ont été reportées agir par sécrétion d'un ou plusieurs facteurs solubles en inhibant la réplication lentivirale chez l'homme (487-489; 643-648), chez les chimpanzés (649; 650), rhésus macaques (650-652), sooty mangabey (497; 653; 654) et les singes verts (474; 655).

Par ailleurs, il faut signaler qu'une activité suppressive de l'IL-16 sur la réplication du VIH a été également décrite (655) cependant son implication dans la pathogénèse du VIH reste à démontrer.

L'infection directe de cellules du système immunitaire par les lentivirus constitue une source importante et continue d'activation du système immunitaire (656). Cette activation conduit à l'augmentation chez les individus infectés, des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  et IL6) par les cellules mononucléées périphériques (657). Il a été également observé une production importante de l'IFN $\gamma$  au niveau des tissus lymphoïdes chez les sujets infectés (657; 658), inversement corrélée au pic d'antigénémie chez les macaques et associé à l'évolution vers la maladie (659). Des taux importants de TNF $\alpha$  et d'IL6 dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien ont également été décrits chez l'homme infecté par le VIH (657), ces cytokines (l'IL6, le GM-CSF et l'IFN $\gamma$ ) semblent réguler la réplication virale en agissant au niveau post-transcriptionnel (657).

Différentes sous population de cellules T CD4<sup>+</sup> ont été décrites chez l'homme selon leur profil de sécrétion de cytokines. En effet, les cellules TH1 qui sécrètent l'IL2 et l'IFN $\gamma$  favorisent les réponses immunes à médiation cellulaire alors que les TH2, qui sécrètent l'IL4, l'IL5 et l'IL10, contrôlent les réponses immunes à médiation humorale (353; 660). Même si certains auteurs font état d'un lien entre la progression vers la maladie et un déséquilibre des

sous population T CD4<sup>+</sup>, avec une transition du profil TH1 vers le profil TH2 (661; 662), des résultats contradictoires ont été décrits (663; 664). Ces divergences semblent provenir de différences entre les approches méthodologiques utilisées et entre les stades de l'infection [pour revue voir (353; 660)].

#### 2. 3.1.2 4 La réponse NK

L'activité cellulaire NK a été trouvée diminuée chez les humains infectés par le VIH (568; 665) dans les deux cas, phases tardive de la maladie (666) et phase précoce (asymptomatique) (667). La diminution de l'activité NK a été attribuée en partie à un défaut fonctionnel (568; 668). Les PBMCs des patients atteints du SIDA ont la capacité de se lier aux cellules cibles, les cellules de lignée K562, mais ne sont pas capables de les lyser, cela est dû à une détérioration du réarrangement des microtubules (568). Dans la phase précoce de l'infection VIH, il n'a pas été observé une diminution du nombre absolu ou de pourcentage des cellules NK (CD16<sup>+</sup>) (666). Au fur et à mesure de la progression de la maladie, le nombre de cellules CD16<sup>+</sup> (632) ou CD56<sup>+</sup> diminue (666) et cela peut contribuer à la diminution de l'activité NK. Comparables aux observations notés chez les humains, les macaques infectés par SIV ont montré une très basse activité NK plus significative que chez les macaques non infectés (498; 633). Ces défauts ont été observés précocement, deux mois après post-infection. Cependant, l'activité NK chez les sooty mangabey infectés par SIV n'est pas différente de celle des mangabés non infectés (498). De même, l'infection expérimentale par le VIH-1 chez les chimpanzés n'a pas d'impact négatif sur l'activité NK (634; 650). Le chimpanzé infecté naturellement par SIVcpz a été bien étudié (650) et l'activité NK chez cet animal a été trouvée significativement très élevée par rapport aux animaux contrôles. Ce qui est intéressant, est que l'activité NK de cet animal fluctuait au delà du temps et tendait à refléter inversement le titre viral dans le sang périphérique (650).

L'ADCC est exercé par les cellules NK armées d'anticorps contre les protéines non-soi de l'organisme. Chez les humains, l'ADCC peut être souvent détectée très tôt dans l'infection à VIH, et souvent plus précocement que les anticorps neutralisants (669-671). Similairement, dans la plupart des études chez les chimpanzés, des anti-VIH-1 ADCC ont été observés tôt après l'infection (671; 672), cependant dans une étude sur le chimpanzé, il a été démontré, que l'ADCC contre le VIH n'a pas été détectable en phase précoce, mais relativement tard après l'infection (670). Par ailleurs, en dépit des souches de laboratoire, l'utilisation d'isolats cliniques VIH a montré chez des chimpanzés qu'ils avaient une réponse

sous population T CD4<sup>+</sup>, avec une transition du profil TH1 vers le profil TH2 (661; 662), des résultats contradictoires ont été décrits (663; 664). Ces divergences semblent provenir de différences entre les approches méthodologiques utilisées et entre les stades de l'infection [pour revue voir (353; 660)].

#### 2. 3.1.2 4 La réponse NK

L'activité cellulaire NK a été trouvée diminuée chez les humains infectés par le VIH (568; 665) dans les deux cas, phases tardive de la maladie (666) et phase précoce (asymptomatique) (667). La diminution de l'activité NK a été attribuée en partie à un défaut fonctionnel (568; 668). Les PBMCs des patients atteints du SIDA ont la capacité de se lier aux cellules cibles, les cellules de lignée K562, mais ne sont pas capables de les lyser, cela est dû à une détérioration du réarrangement des microtubules (568). Dans la phase précoce de l'infection VIH, il n'a pas été observé une diminution du nombre absolu ou de pourcentage des cellules NK (CD16<sup>+</sup>) (666). Au fur et à mesure de la progression de la maladie, le nombre de cellules CD16<sup>+</sup> (632) ou CD56<sup>+</sup> diminue (666) et cela peut contribuer à la diminution de l'activité NK. Comparables aux observations notés chez les humains, les macaques infectés par SIV ont montré une très basse activité NK plus significative que chez les macaques non infectés (498; 633). Ces défauts ont été observés précocement, deux mois après post-infection. Cependant, l'activité NK chez les sooty mangabey infectés par SIV n'est pas différente de celle des mangabés non infectés (498). De même, l'infection expérimentale par le VIH-1 chez les chimpanzés n'a pas d'impact négatif sur l'activité NK (634; 650). Le chimpanzé infecté naturellement par SIVcpz a été bien étudié (650) et l'activité NK chez cet animal a été trouvée significativement très élevée par rapport aux animaux contrôles. Ce qui est intéressant, est que l'activité NK de cet animal fluctuait au delà du temps et tendait à refléter inversement le titre viral dans le sang périphérique (650).

L'ADCC est exercé par les cellules NK armées d'anticorps contre les protéines non-soi de l'organisme. Chez les humains, l'ADCC peut être souvent détectée très tôt dans l'infection à VIH, et souvent plus précocement que les anticorps neutralisants (669-671). Similairement, dans la plupart des études chez les chimpanzés, des anti-VIH-1 ADCC ont été observés tôt après l'infection (671; 672), cependant dans une étude sur le chimpanzé, il a été démontré, que l'ADCC contre le VIH n'a pas été détectable en phase précoce, mais relativement tard après l'infection (670). Par ailleurs, en dépit des souches de laboratoire, l'utilisation d'isolats cliniques VIH a montré chez des chimpanzés qu'ils avaient une réponse

ADCC plus large que chez l'humain (669). L'ADCC a été trouvée après vaccination chez des singes verts infectés avec du virus SIVagm entier inactivé (673) et chez des rhesus macaques infectés par SIVmac (674). Comme il a été observé dans le cas de la cytotoxicité spécifique VIH, le rôle exact des ADCC anti-VIH n'est pas complètement élucidé. L'ADCC a aussi été considérée comme seule cause de déplétion des cellules CD4<sup>+</sup> par lyse des cellules non infectées qui ont absorbé la gp120 (674; 675) ou les régions homologues entre la gp41 et le CMH de classe 2 domaine beta-1 (676).

### 2. 3.1.2 5 Les réponses suppressives

Les cellules suppressives n'ont pas encore été complètement définies ou caractérisées. En effet, le concept d'une sous population suppressive isolée, a fait l'objet d'interrogations ces dernières années. Il semble possible que quelques cellules puissent simplement exhiber un état suppressif. La suppression spécifique de l'antigène est médiée par des cellules qui ont été rendues anergiques, en compétition avec les cellules actives pour les ligands et les cytokines (227). Une suppression spécifique a été médiée par certaines cytokines, par exemple TGF- $\beta$ , IL-4, et IL-10 (227; 677). Chez les humains, on peut définir comme cellules suppressives potentielles, les cellules CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> qui exercent une action suppressive sur les CTL spécifiques du HLA, les cellules NK et les cellules LAK qui agissent par le moyen de facteurs solubles (678; 679). En se basant sur ces découvertes *in vitro*, ces populations cellulaires ont été suggérées être impliquées dans la pathogénèse du SIDA (678-680). Une augmentation des cellules CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> a été décrite chez les patients atteints de SIDA (606; 681), quoique les valeurs pronostiques ont été mises en question (360). On a retrouvé chez un petit groupe de patients atteints de SIDA ayant des symptômes cliniques et de survie courte, une lymphocytose à CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, avec une infiltration diffuse de ces cellules dans la rate et les organes lymphoïdes (682). L'évaluation de ces cellules chez les autres espèces de primates n'a pas donné de résultats à cause des difficultés à mettre en évidence des populations cellulaires CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> chez les primates non humains (634).

Les facteurs solubles sécrétés par les lymphocytes CD8<sup>+</sup> et possédant une activité antivirale jouent également un rôle dans l'évolution de l'infection à VIH. Le premier facteur décrit, le CAF, est capable d'inhiber la réplication virale par un mécanisme non cytolitique et non restreint par le CMH (487; 488). Ce facteur qui ne correspond à aucune cytokine ou chimiokine connue actuellement (683; 684) agit au niveau de la transcription du LTR du VIH (685; 686) et son activité est corrélée à l'évolution de la maladie (373; 687). La nature exacte

de ce facteur est sujette à controverse mais on sait qu'il peut être secrété aussi bien par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> du sang périphérique que ceux des ganglions (688) indépendamment de l'activité CTL ou non de ces cellules (689).

Les réponses immunes cellulaires, qu'elles soient cytotoxiques ou suppressives, sont fortement dépendantes de facteurs génétiques de l'hôte. En effet, comme nous l'avons souligné plus haut, l'efficacité des réponses CTL vis-à-vis du VIH est fortement corrélée à la capacité des allèles du CMH de classe I de se lier à plusieurs épitopes viraux. De même, l'activité inhibitrice des chimiokines ne saurait être dissociée du niveau d'expression de leurs récepteurs à la surface des cellules cibles du VIH.

### **2.3.2 Les facteurs génétiques**

#### **2.3.2.1 Les corécepteurs**

La mise en évidence durant ces dernières années, de l'influence dans l'infection par le VIH de certains allèles des gènes des co-récepteurs, a permis de mieux comprendre les variabilités individuelles chez les personnes infectées.

L'allèle qui a été le premier et le plus étudié est un allèle du gène CCR5 pour lequel une délétion de 32 paires de bases (CCR  $\Delta$ 32) a été décrite surtout dans les populations caucasiennes et moins dans les populations asiatiques et africaines (690; 691). Elle correspond à la deuxième boucle extra-cellulaire de la protéine et produit un récepteur tronqué et non fonctionnel qui n'est pas exprimé à la surface de la cellule (690; 692). Les individus homozygotes pour cet allèle (CCR  $\Delta$ 32/CCR  $\Delta$ 32) sont protégés contre l'infection par le VIH (331; 690; 691; 693) même si quelques cas d'infections ont été décrits (335; 694; 695). Chez les individus hétérozygotes (CCR5/CCR  $\Delta$ 32), l'expression du co-récepteur CCR5 à la surface des cellules est nettement diminuée du fait de la formation de dimères (protéine tronquée/protéine normale) qui sont retenus dans le réticulum endoplasmique (696). La sensibilité à l'infection des cellules CD4<sup>+</sup> de ces individus par des virus R5 est beaucoup plus faible que celle observée chez des individus ne portant pas la mutation (697). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'hétérozygotie, même s'il ne protège pas contre l'infection, n'en est pas moins un facteur pouvant influencer sur la progression vers la maladie (333; 693; 698; 699). Cette protection contre la progression vers la maladie serait due, au moins en partie, à la faible charge virale consécutive au contrôle efficace de la réplication virale et au maintien relatif du

nombre de cellules CD4+ chez ces personnes comparativement aux individus qui ne portent pas cette mutation (333).

Ces données, renforcées par le fait qu'aucune pathologie associée à cette délétion n'ait pu être détectée jusqu'à présent, ouvrent des perspectives vaccinales et thérapeutiques nouvelles qui ont conduit à la recherche d'autres variants alléliques du gène CCR5. Une vingtaine de variants ont été décrits (700; 701) dont un qui serait impliqué dans la résistance à l'infection. Ce variant, CCR5 m303, possède en effet une mutation à l'origine d'un codon stop prématuré qui, si elle est exprimée en *trans* par rapport à la mutation  $\Delta 32$ , empêche l'expression du co-récepteur à la surface (701).

Une mutation ponctuelle, V64I, dans le gène CCR-2b a été également associée à une progression plus lente vers la maladie (334; 335; 702; 703). Cette mutation est retrouvée chez des populations d'origines différentes avec une fréquence allélique qui varie entre 10 et 15% (335; 702). Le mécanisme par lequel cette mutation peut conférer une protection partielle contre la progression vers la maladie est inconnu et semble différent de celui utilisé par la mutation CCR  $\Delta 32$ . En effet, (i) le remplacement d'une valine par une leucine, deux acides aminés aux propriétés physico-chimiques très proches, ainsi que (ii) la capacité des virus utilisant CCR2b d'infecter indifféremment *in vitro* les cellules présentant la forme sauvage ou la forme mutée (704) ne vont pas dans le sens d'une modulation de l'expression. Il est probable que cette mutation est en déséquilibre de liaison avec d'autres mutations, comme par exemple la mutation ponctuelle CCR5-59653T située dans la région régulatrice du gène CCR5 (334).

### 2.3.2.2 Les marqueurs alléliques

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est constitué par l'association de plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la reconnaissance cellulaire et la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les antigènes du CMH de classe I et classe II sont très polymorphes chez l'homme. Ce polymorphisme joue un rôle important dans la spécificité des réponses immunes antivirales T et B et plusieurs études ont été menées afin de corréler l'histoire naturelle de l'infection à VIH et la présence de combinaisons particulières d'allèles du CMH. Ainsi plusieurs allèles du CMH qui pourraient être impliqués dans la prédisposition ou la protection contre l'infection à VIH ou la maladie ont été décrits.

Par exemple les haplotypes HLA-A2 et HLA-DR13 ont été trouvés significativement liés à la résistance à l'infection chez des populations ayant des comportements à risque,

comme les prostituées de Nairobi (705). De même, les haplotypes HLA-A1, HLA-B8 et HLA-DR3 ont été trouvés associés à une susceptibilité accrue à l'infection ainsi qu'à une évolution plus rapide des personnes infectées vers la maladie (706; 707). L'étude des ATL a permis de montrer une fréquence particulièrement plus élevée, en comparaison de la population totale, de certains haplotypes de classe I chez ces individus (708).

Plusieurs mécanismes pourraient rendre compte des associations observées entre certains haplotypes HLA et les différents profils d'évolution vers la maladie des individus infectés par le VIH (707; 709-711).

- 1) La capacité de certaines molécules HLA à présenter de manière efficace des épitopes viraux immunodominants pourrait expliquer leur association avec une progression plus lente, voire une absence de progression vers la maladie. A l'opposé, l'absence de cet effet protecteur pourrait être associé à une progression plus rapide vers la maladie (708; 712).
- 2) Certaines molécules HLA pourraient promouvoir des réponses immunes délétères contre certains épitopes viraux ou certains types cellulaires infectés par le VIH (709).
- 3) Certaines molécules relativement rares pourraient faciliter la reconnaissance rapide et la destruction des cellules allogéniques infectées, notamment pendant les phases précoces de l'infection (190; 713; 714).
- 4) Les associations observées pourraient en fait être liées à d'autres gènes comme des gènes du complément ou du TNF $\alpha$  (711; 715).
- 5) Le niveau d'expression de certaines molécules HLA à la surface de cellules infectées pourraient contribuer à leur destruction par les cellules NK (716).
- 6) Les gènes transporteurs TAP, qui permettent la présentation de l'antigène auraient également un rôle dans l'évolution vers la maladie (708).

Les études visant à établir une corrélation entre un génotype particulier et une maladie donnée sont souvent confrontées à des problèmes méthodologiques. Sans remettre en cause certaines associations entre un haplotype particulier et le profil d'évolution chez des individus infectés, il est important de signaler que la majorité de ces études a été effectuée chez des individus appartenant à des groupes ethniques différents, infectés par différentes souches virales et qui présentent des facteurs de risque différents. En effet, ces considérations peuvent expliquer un certain nombre de données contradictoires et mettent en lumière la nécessité de mieux circonscrire les différentes variables. Par exemple, l'haplotype HLA-DR5 a été associé soit à une progression rapide (717) soit à une progression lente vers la maladie (718). L'étude



de différents groupes ethniques infectés par les mêmes souches virales et présentant les mêmes facteurs de risques serait plus à même de définir de manière claire les allèles ou haplotypes HLA liés à la protection contre l'infection ou à un profil d'évolution particulier.

#### **2.4. Les facteurs exogènes et la réplication du VIH**

Ces facteurs exogènes de l'infection VIH contribueraient à l'accélération de la destruction de l'immunité et donc à la progression vers le SIDA. Plusieurs études ont montré que le VIH se réplique de manière plus efficace dans les cellules activées (719-722) et que la charge virale augmente lors de la stimulation du système immunitaire des individus infectés par des stimuli exogènes tels que les agents pathogènes opportunistes (723-725). Cette augmentation est associée à l'expression de certaines cytokines (726; 727) et se traduit par une progression plus rapide vers la maladie (728)

### **3. Les mécanismes hypothétiques de la résistance à l'infection**

L'analyse de données séro-épidémiologiques a permis de mettre en évidence une catégorie d'individus qui demeurent non infectés malgré de multiples expositions au virus. C'est le cas par exemple de certaines prostituées de Gambie et du Kenya (611; 729) et de certains partenaires de sujets infectés (287). Plusieurs facteurs immunologiques et génétiques de l'hôte ont été impliqués dans cette résistance à l'infection par le VIH.

Il a d'abord été suggéré que l'immunité cellulaire pouvait être particulièrement efficace chez les individus résistants. Cela impliquerait (i) une pré-existence de ces facteurs d'hôte au site de l'infection, qui pourrait être due par exemple à des contacts antérieurs avec des doses non infectantes de virus, ou (ii) une apparition rapide de ces facteurs après exposition au virus. Cette immunité pourrait par exemple permettre la destruction des cellules infectées par les CTL avant leur dissémination dans l'organisme. Selon certains auteurs la présence d'allèles HLA très rares pourraient contribuer à la reconnaissance et la destruction rapide par les CTL des cellules allogéniques infectées (713; 714). De même, la présence d'une réponse T auxiliaire spécifique du VIH pourrait stimuler les CTL, ou toute autre réponse immune protectrice, et contribuer ainsi à la résistance à l'infection. Enfin, il faut noter qu'il existe également des arguments en faveur de l'intervention efficace des effecteurs humoraux de l'immunité mucoale, à savoir les anticorps IgA et IgG (730-732).

La résistance à l'infection a également été associée à la sur-expression des  $\beta$  chimiokines chez certains individus (733; 734). En effet, à de fortes concentrations les  $\beta$  chimiokines (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , et RANTES) pourraient se lier efficacement à la molécule CCR5 et empêcher ainsi l'entrée des virus R5 dans les cellules cibles.

Plus récemment l'association de délétion ou de mutations au niveau des deux allèles codant pour le co-récepteur CCR5 (690; 691; 701) et la résistance à la maladie a été décrite (voir chapitre 2.3.2.1).

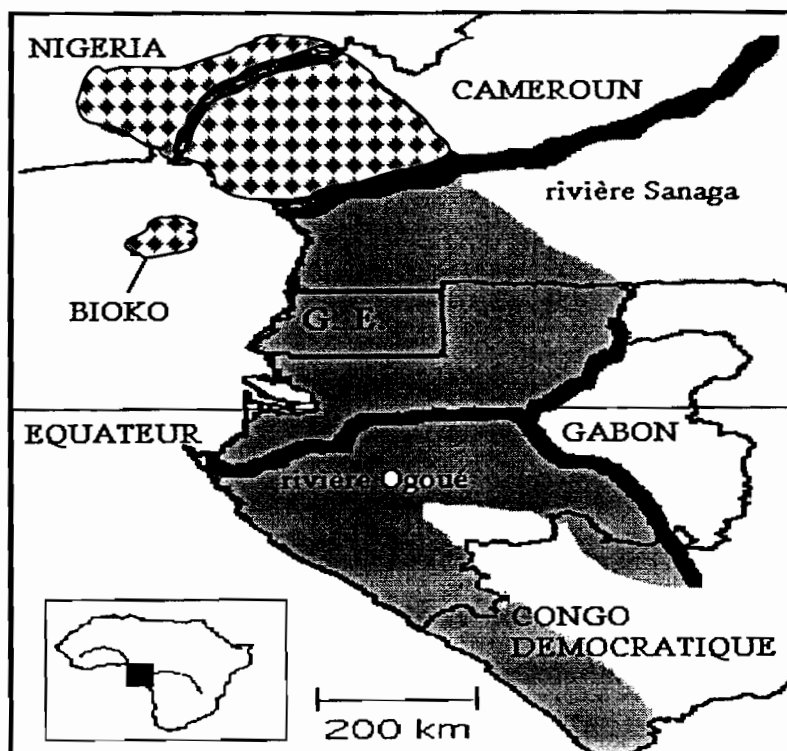
Les facteurs et les mécanismes évoqués ci-dessus ne peuvent expliquer totalement la (les) raison (s) de la résistance à l'infection chez les individus exposés au virus et qui demeurent séronégatifs. Il est en effet envisageable que l'exposition à des virus défectifs et/ou à d'autres pathogènes pouvant induire une immunisation croisée ou la favoriser puissent être à l'origine de la résistance à l'infection chez certains individus.

Ces différentes considérations témoignent de la complexité de la physiopathologie de l'infection à VIH. Si beaucoup de progrès ont été effectués ces dernières années, il n'en demeure pas moins qu'un certain nombre de mystères restent à élucider.

## V. Histoire naturelle des SIVmnd isolés des mandrills

### 1. Histoire naturelle de l'espèce *Mandrillus sphinx*

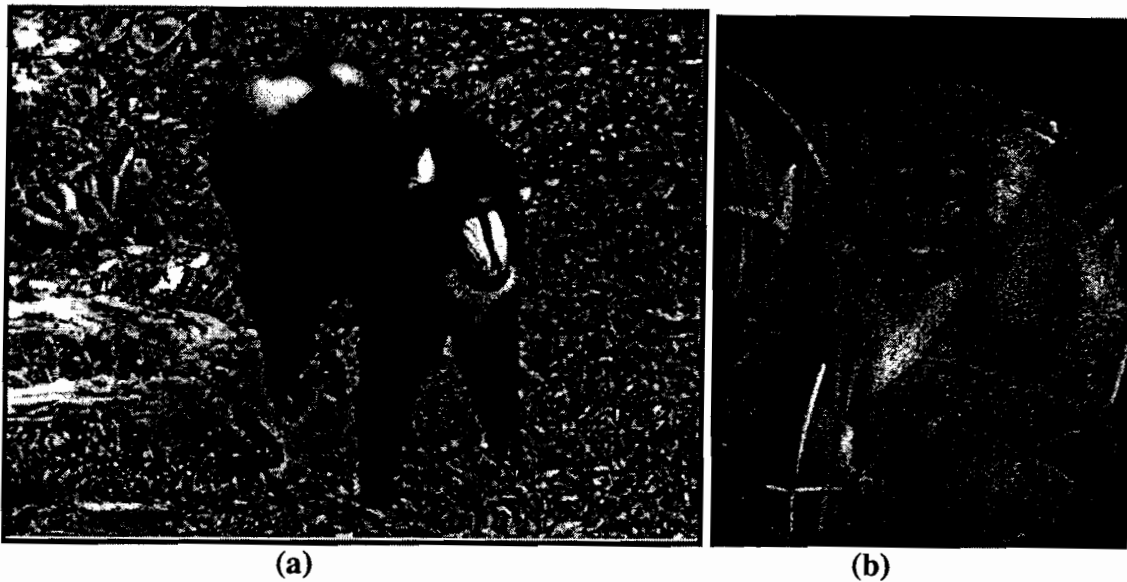
C'est un animal de forêt appartenant à la famille des *Cercopithecidae*, à la sous famille des *Cercopithecinae*, au genre *Mandrillus* dans lequel, on retrouve aussi le Drill (*Mandrillus Leucophaeus*). Sa distribution est de type côtier atlantique et va de Sanaga au Kouilou (figure 11). Primate omnivore, il est domicilié dans la grande forêt tropicale humide, et est retrouvé exclusivement en Afrique Centrale, dont Rio Muni (Congo Démocratique), dans la majeure partie du Gabon, en Guinée-Équatoriale, au Sud du Cameroun et au Nord-Ouest du Congo-Brazzaville (266), mais il est retrouvé aussi au sud de ce pays.



■ Mandrills    ▣ Drills

G. E. : GUINEE EQUATORIALE

Les deux sexes partagent un pelage globalement brun olive, une barbe orangée et une crête sagittale alors que le ventre et les parties inférieures des membres sont blanchâtres. Les mâles adultes (Figure 12a) sont violemment colorés. Leur face et leurs postérieurs mêlent du rouge vif, du blanc et du bleu électrique. Le pénis et le tour de l'anus sont rouges. La croupe nue est colorée en rose et bleu. De part et d'autre du nez rouge surmonté d'une ligne également rouge, s'observent une série de profondes rides bleues. Ces colorations sont beaucoup moins prononcées chez les femelles (Figure 12b) qui sont par ailleurs deux fois plus petites. Les jeunes sont par contre de couleur olive terne et la barbe orangée est la première coloration à apparaître avec l'âge.



**Figure 12 : Mandrill mâle (a) et femelle (b)**

Les mâles ont un poids qui varie entre 20 et 35 kg, le poids moyen des femelles est d'une dizaine de kilogrammes. Les mâles les plus lourds (25 à 35 kg) sont plus brillamment colorés ; d'autres dont le poids ne dépasse pas 25 kg, sont plus ternes : les gros mâles assureraient l'essentiel de la reproduction. Les mandrills collectent 75% de leur nourriture au sol et dans les basses strates de la forêt. Les observations indirectes sur la composition de leur régime (analyse de crottes) tendent à privilégier une alimentation frugivore et granivore, tandis que les observations directes suggèrent un plus grand éclectisme. Les mandrills ingéraient plus de matière foliaire provenant notamment des plantes herbacées (marantacées, zingibéracées). Ils mangent également des tubercules, des racines, et des champignons. Par ailleurs, ils passent une grande partie de leur temps à fourrager dans la litière : dans ce cas, les aliments prélevés restent souvent non identifiés. Les proies (environ 10% du régime) sont

variées : fourmis, termites, orthoptères, araignées, tortues, grenouilles et même scorpions. Ils chassent occasionnellement des petits céphalophes, des petits rongeurs, des musaraignes voire des porcs-épics et pillent régulièrement les nids d'oiseaux tant pour les œufs que pour les oisillons (735).

Les mandrills ne se déplacent qu'en groupe de 30 à 50 animaux, avec approximativement un adulte mâle par groupe, toutefois il a été observé plusieurs hordes de mandrills allant jusqu'à 300 ou 400 animaux, le ratio étant toujours maintenu (un adulte mâle pour 50 mandrills) (736-738). Les déplacements journaliers sont estimés à un dizaine de kilomètres (735).

## **2. Les caractéristiques biologiques des mandrills**

Les caractéristiques biologiques des mandrills restent imprécises. La maturité sexuelle est atteinte vers 4 ans ; la gestation dure 6 mois ; l'intervalle entre les naissances serait de 15 à 18 mois. Leur longévité pourrait atteindre 40 ans.

Sur le plan hématologique et biochimique (Tableau 3 et 4), quelques valeurs normales ont été décrites pour le mandrill (739-741). Ces résultats ont démontré que les paramètres hématologiques des primates non humains dont les mandrills, étaient similaires à ceux des humains et des autres espèces de *Cercopithecidae*, du genre, *Cercopithecus*, *Papio* et *Macaca* (739). Bien que les valeurs de globules rouges soient identiques à ceux des humains (739), le taux d'hématocrite et d'hémoglobine sont faiblement bas (741), les globules blancs ne sont pas différents des valeurs moyennes des humains (739). Les protéines sériques et les valeurs biochimiques du sérum sont similaires aux valeurs usuelles trouvées chez l'homme (742), sauf les ions qui sont faiblement plus bas par rapport aux valeurs trouvées chez l'homme (742). Ces informations sont importantes afin de les utiliser à la fois dans les évaluations cliniques aussi bien que pour comparer les valeurs des autres membres de la famille des *Cercopithecidae*. Par ailleurs, les facteurs tels que le type d'anesthésie, le sexe, les parasites intestinaux, le poids, le stress et le temps de captivité (740) peuvent affecter les paramètres hématologiques et biochimiques de ces animaux.

**Tableau 3 : Valeurs hématologiques chez les mandrills et mangabés en captivité (741).**

	<i>C. torquatus lunatus</i>			<i>M. sphinx</i>		
	N	moyenne	écart-type	N	moyenne	écart-type
Ht (%)	9	38,5	± 2,80	7	38,4	± 1,40
GR (x10 <sup>6</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	9	4,97	± 0,30	7	5,06	± 0,30
Hb (g/l)	9	12,6	± 1,10	7	13,5	± 1,40
VGM (fl)	9	77,7	± 6,10	7	76,1	± 4,50
TCMH(pg/cel)	9	25,4	± 2,10	7	26,6	± 2,20
CCMH (%)	9	32,8	± 1,50	7	35,1	± 2,60
GB (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	9	5,51	± 2,41	7	8,35	±2,04
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	9	2,72	± 1,47	7	4,84	± 2,86
Neutrophiles (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	9	2,95	± 1,84	7	3,33	± 2,02
Eosinophiles (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	9	0,07	± 0,12	7	0,12	± 0,09
Monocytes (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	9	0,06	± 0,04	7	0,03	± 0,05
Basophiles (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	9	0,01	± 0,01	7	0,02	± 0,04

**Tableau 4 : Valeurs biochimiques, protéiques, osmolalité et en ions chez les mandrills et mangabés en captivité (741).**

	<i>C. torquatus lunatus</i>			<i>M. sphinx</i>		
	N	moyenne	écart-type	N	moyenne	écart-type
ASAT (UI/l)	9	19,7	± 7,10	7	13,2	± 2,20
ALAT (UI/l)	9	23,2	± 9,10	7	24,6	± 9,90
CPK (UI/l)	9	293	± 281	7	177	± 88
LDH (UI/l)	9	238	± 76	7	225	± 75,9
GGT(UI/l)	9	39,4	± 14,2	7	47,1	± 6,60
PAL (UI/l)	9	745	± 555	7	499	± 553
Glucose (mmol/l)	8	6,22	± 2,39	7	4,23	± 0,52
Urée (mmol/l)	8	4,52	± 1,02	7	5,56	± 0,94
Acide urique (mmol/l)	9	5,94	± 11,3	7	14,7	± 5,30
Créatinine (mmol/l)	8	77	± 13	7	121	± 11
Cholesterol (mmol/l)	8	4,30	± 0,67	7	3,91	± 1,20
Protéines (g/l)	8	7,4	± 0,90	7	7,90	± 0,40
Albumine/ globuline (ratio)	8	1,90	± 0,60	7	1,80	± 0,40
Albumine (g/l)	8	4,70	± 0,70	7	5,10	± 0,40
α-Globuline (g/l)	8	0,80	± 0,20	7	1,20	± 0,20
α <sub>1</sub> -Globuline (g/l)	8	0,20	± 0,10	7	0,30	± 0,10
α <sub>2</sub> -Globuline (g/l)	8	0,50	± 0,20	7	0,90	± 0,10
β-Globuline (g/l)	8	0,60	± 0,20	7	0,50	± 0,20
γ-Globuline (g/l)	8	1,20	± 0,40	7	1,20	± 0,30
Osmolalité (mOsm/kg)	8	283	± 5	7	295	± 5
Sodium (mmol/l)	8	142	± 2	7	145	± 7
Potassium (mmol/l)	8	4,00	± 0,48	7	3,80	± 0,81
Calcium (mmol/l)	8	1,86	± 0,12	7	2,06	± 0,17
Phosphore (mmol/l)	8	4,45	± 0,96	7	4,27	± 0,85
Magnesium (mmol/l)	8	0,66	± 0,06	7	0,65	± 0,07
Chlorures (mmol/l)	8	95,5	± 3,50	7	86,9	± 1,90

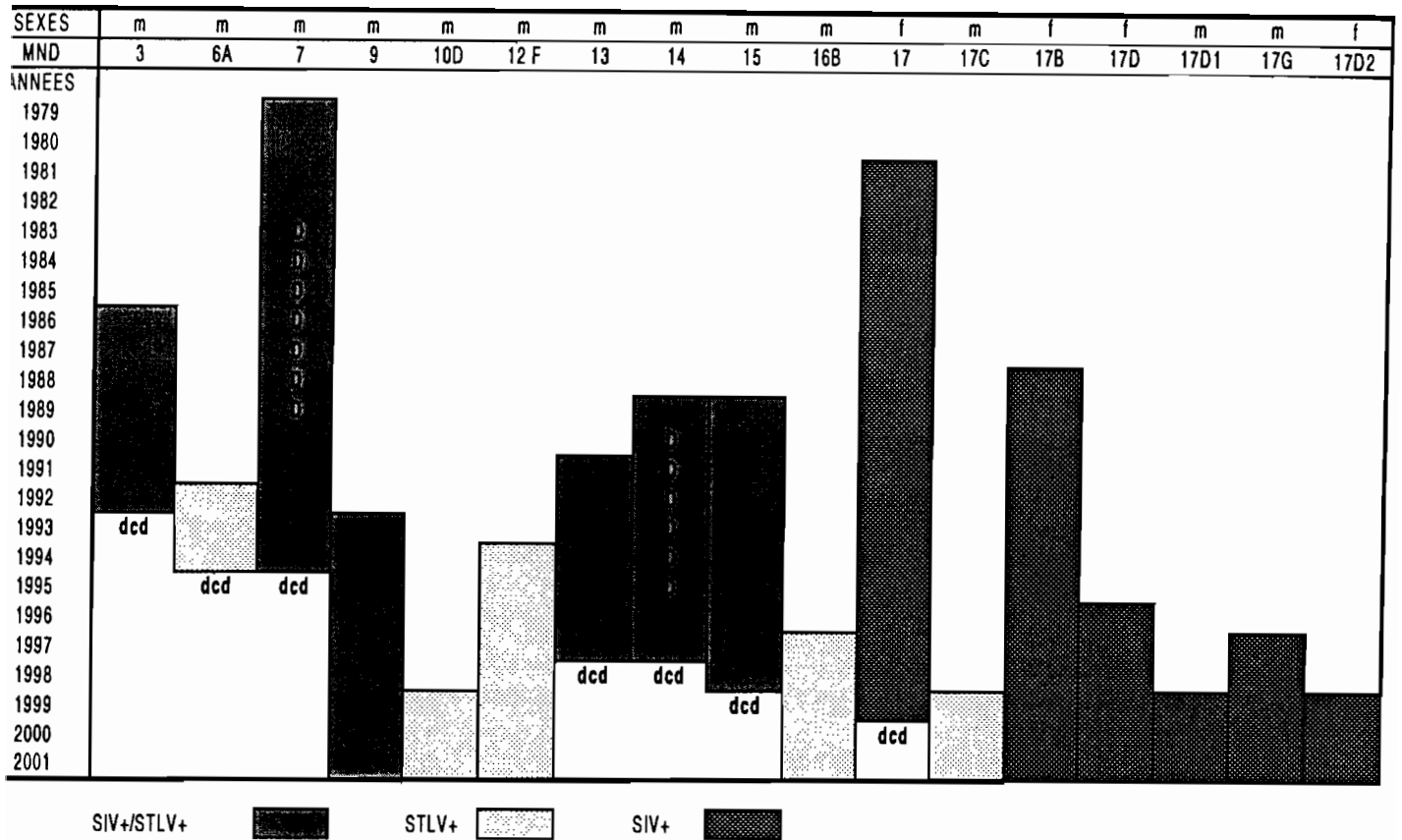
### 3. Caractérisation du SIVmnd-1 et SIVmnd-2

En 1989, SIVmnd a été isolé d'un mandrill (*Mandrillus sphinx*) vivant au sein de la colonie du Centre International de Recherche Médicale de Franceville (CIRMF) au Gabon (18). L'isolat a été caractérisé à partir des lymphocytes d'un animal déjà séropositif lors de sa capture (229). D'autres mandrills séropositifs vivant en captivité et originaires d'autres régions d'Afrique Centrale ont été signalées (6). Les séquences génétiques des SIVmnd indiquent que ces virus sont distincts des autres groupes VIH et SIV. SIVmnd semble occuper une position phylogénétique intermédiaire à équidistance des VIH-1 et VIH-2/SIV (18). L'analyse phylogénétique de la souche SIVmnd (isolat GB1) a montré que le virus constitue un groupe à part, différent des autres groupes VIH/SIV précédemment décrit (18; 743) et proche du SIVhoest (180). Il a été rapporté que cette souche utilise le co-récepteur CXCR4 et non-CCR5 pour entrer dans les cellules humaines contrairement à la très grande majorité des autres SIV (408).

Le deuxième virus du mandrill (SIVmnd-2) a été récemment caractérisé chez des mandrills du CIRMF ou sauvages du Gabon et du Cameroun (15). Les séquences complètes sont actuellement disponibles et les analyses phylogénétiques ont montré que dans les régions *gag* et *pol* le SIVmnd-2 isolé des mandrills vivant en semi-liberté dans la colonie de mandrills du CIRMF, sont groupés avec le SIVrcm, isolé du *Cercocebus torquatus torquatus*, alors que dans le gène *env* est groupé avec le SIVmnd-1, ce qui suggère un événement de recombinaisons entre le SIVmnd-1 et le SIVmnd-2 chez les mandrills (15) (voir article 2)

Au CIRMF, la colonie de mandrills en semi-liberté a été initiée entre 1979 et 1981. Ces animaux étaient soit des petits, orphelins amenés par les chasseurs, soit de jeunes singes piégés. Les souches SIVmnd prototypes ont été isolées de deux animaux séropositifs parmi les 17 mandrills fondateurs de la colonie. Ces deux animaux (mandrills 7 et 17), séropositifs dès leur acquisition par le CIRMF en 1979 et 1983 ont donc été infectés lors de leur vie à l'état sauvage. A ce jour en 2001, sur un total de 166 mandrills vivant ou ayant vécu au CIRMF, 9 ont été retrouvés séropositifs, 7 mâles (7, 9, 13, 14, 15, 17D1 et 17G) et 4 femelles (17, 17B, 17D et 17D2). La Figure 13 résume l'apparition dans le temps des séropositivités des mandrills du CIRMF.





**D** : dominance

**dcd** : décédé

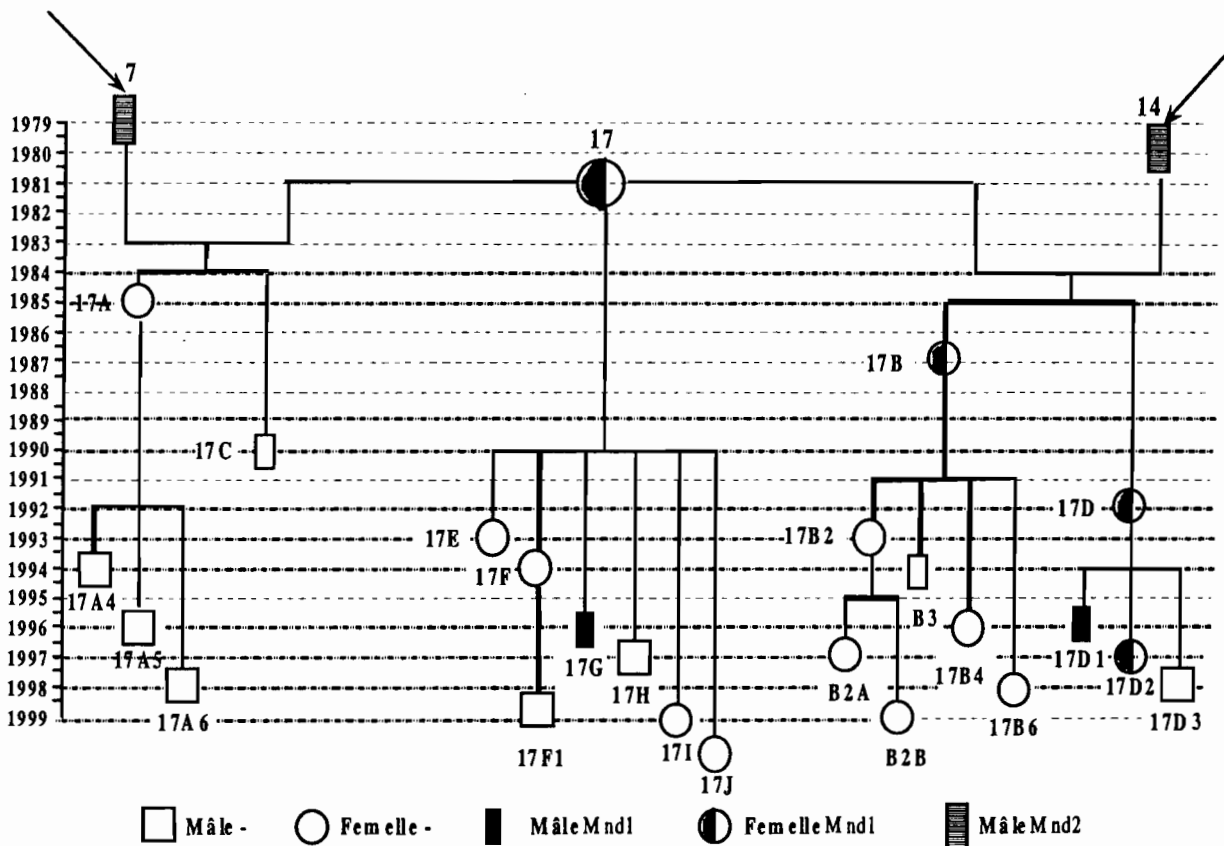
**m** : mâle

**f** : femelle

**MND** : mandrill

**Figure 13 : Historique de la colonie: sérologies SIV/STLV positives lors de l'hébergement enclos commun entre 1979 et 2001.**

Le taux de transmission verticale de SIVmnd (Figure 14) semble atteindre un taux de 30% (trois descendants sur dix de femelle 17 étant infectés). Les études sur le terrain ont aussi montré un taux de séropositivité chez les juvéniles qui cadre bien avec cette hypothèse (70; 744).



**Figure 14 : Historique de la transmission verticale: sérologies SIV positives lors de l'hébergement en commun entre 1979 et 1999.**

Les mâles 3, 7, 14, 15, 9 et 13 (mâles fondateurs de la colonie infectés par le SIVmnd-2) sont aujourd'hui décédés sans qu'aucune pathologie similaire au SIDA de l'homme n'ait été mise en évidence.

Aucun animal séropositif n'a présenté, tout au long des 10 ans de suivi clinique standardisé de signes d'immunodéficience (70). Sur la base des observations sérologiques, il

n'y a aucun cas de transmission sexuelle de SIVmnd des mâles vers les femelles de la colonie. Les empreintes génétiques confirment pourtant le rôle majeur dans la fécondation joué par le mâle dominant infecté n°7: 88% des femelles ont été fécondées par ce mâle avant 1990 et 12% par le mâle 14 également infecté. Après 1990, le mâle 14 est responsable de 75% des naissances. La transmission sexuelle semble donc un événement rare chez les mandrills. Tous les mâles ayant séroconverti depuis leur arrivée au CIRMF l'ont fait à l'âge adulte, la transmission de SIVmnd survenant probablement au cours des joutes entre mâles (70).

Les mêmes particularités de transmission sont retrouvées pour les infections STLV-1. La prévalence est de 5,8% dans la colonie et seuls les mâles sont infectés. Deux mandrills les n° 7 et 9 ont séroconverti pour STLV lors de leur enfance puisqu'ils sont arrivés déjà séropositifs au CIRMF à l'âge de un an. Tous les autres ont séroconverti à l'âge adulte.

Ces observations sont en accord avec l'hypothèse d'une transmission lors des rixes inter-mâles pour la domination. Les co-infections avec STLV sont quasi-systématiques chez les singes SIV séropositifs ; les différences d'apparition dans le temps des anticorps reflètent soit des transmissions selon différents événements, soit un intervalle plus long pour l'apparition des anticorps anti-STLV.



**OBJECTIFS DE LA  
THÈSE**

## OBJECTIFS DE LA THESE

Devant la progression inquiétante des infections VIH plus particulièrement en Afrique et en Asie, mais aussi dans le monde entier, il paraît urgent de trouver des moyens thérapeutiques et vaccinaux afin d'enrayer ce fléau qui menace les populations actuelles. Pour cela, il paraît impératif de développer des modèles d'étude simiens dans le but de comprendre les facteurs de résistances impliqués dans la non pathogénicité de l'infection chez certains modèles non pathogènes. Nous disposons au CIRMF de singes naturellement infectés qui peuvent servir de modèles d'infection lentivirale pathogènes et non pathogènes. Nous avons choisi de nous intéresser aux facteurs viraux et spécifiques de l'hôte qui pourraient être à l'origine de la résistance au SIDA à l'aide du modèle d'infection naturelle des mandrills du Gabon par le SIVmnd-1.

Il a été démontré dans certaines études que la transmission inter-espèce se traduit par une rupture d'équilibre chez l'hôte conduisant à l'apparition de symptômes associés au SIDA. Le SIVmnd-1 est probablement un virus cross-transmis au mandrill par une espèce hétérologue du genre *Cercopithecus*. Cette transmission semble être très lointaine, et le virus se serait adapté à son nouvel hôte.

L'infection naturelle SIVmnd chez le mandrill présente des caractéristiques, dont certains points nous ont interpellé, (i) infection naturelle non pathogène avec des charges virales basses mesurées en dilution limite et anticorps neutralisants faibles, (ii) absence de transmission sexuelle mâle/femelle et existence de cas de transmissions verticales dans la colonie, (iii) tropismes cellulaires variables en fonction des souches (iv) une variabilité des réponses sérologiques (v) et enfin, le fait que le SIVmnd-1 chez le mandrill ait été le résultat d'une transmission inter-espèce.

L'étude des caractéristiques virologiques, sérologiques et immunologiques de l'infection lentivirale SIVmnd-1 chez le mandrill lors de la primo-infection et en phase chronique doit permettre une meilleure compréhension des mécanismes biologiques responsables de la non-pathogénicité de ces lentivirus, et de connaître la pathogenèse des infections humaines. Aussi, par la connaissance des mécanismes d'adaptation des lentivirus chez leur hôte, le mandrill pourrait représenter un modèle intermédiaire entre le modèle pathogène et non pathogène

En conséquences, les objectifs de cette thèse sont de mieux comprendre la non pathogénicité de SIVmnd au cours de l'infection lentivirale naturelle et la raison du faible taux de transmission hétérosexuel au sein de la colonie et plus spécifiquement:

1. Déterminer les paramètres biologiques et immunologiques du mandrill
2. Effectuer la caractérisation moléculaire et phénotypique du SIVmnd
3. Etudier les paramètres virologiques lors de la primo-infection et de la phase chronique de *Mandrillus sphinx* infecté par SIVmnd-1
4. Etudier la réponse immune, humorale et cellulaire, et les corrélés à la dynamique de la charge virale en primo-infection, puis en phase chronique

Pour atteindre ces objectifs, notre démarche a consisté à:

- Mettre en place des outils biologiques et immunologiques sur des singes sains et infectés par SIV et/ou STLV afin d'établir des paramètres physiologiques de bases.
- Mettre en place des outils virologiques: Isolement des virus, amplification et séquençage du SIVmnd, et enfin quantification du virus par RT-PCR sur du plasma de mandrills infectés par SIVmnd-1, afin d'évaluer sa répllication *in vitro* et *in vivo*.
- Etudier l'évolution des différentes populations lymphocytaires tout au long de l'infection, en marquant les antigènes de surfaces des différents groupes cellulaires avec des anticorps monoclonaux.
- Etudier les corécepteurs lors de la primo-infection du SIVmnd-1.



**MATÉRIEL  
ET  
MÉTHODES**

# MATERIEL ET METHODES

## I. Matériel biologique

Le CIRMF est situé au sud-est Gabon, dans la province la province du Haut-Ogoué. Ce centre possède 6 unités de recherches regroupées en trois grands départements (Virologie, Parasitologie et Primatologie/Ecosystèmes tropicaux). Nous avons effectué nos travaux de recherche dans le laboratoire de Rétrovirologie (département de Virologie). Les prélèvements et les suivis des animaux inclus dans nos études ont été effectués au centre de primatologie par des vétérinaires.

### 1. Sujets et infection

#### 1.1- Choix des sujets

##### 1.1.1 Pour les études *in vitro*

Le CIRMF possède à l'heure actuelle une colonie de 400 primates non-humains, certains d'entre eux sont hébergés en cage commune (6 au maximum) ou individuelle au centre de primatologie, d'autres vivent en semi-liberté en enclos.

Le criblage sérologique systématique de plasma humains et de tous les singes de la colonie, nous a permis de sélectionner des donneurs humains séronégatifs et de trouver un certain nombre d'animaux SIV positifs /STLVpositifs et SIV négatifs /STLVnégatifs.

Le contrôle a été effectué en ELISA (Genelavia mixt I/II Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr) et confirmé pour les sujets positifs en Western-blot (New Lav Blot VIH 2.2 Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr & HTLV Blot 2.3 Genelabs diagnostics, Singapour). Il s'agit;

- De 17 donneurs humains adultes âgés entre 20 et 30 ans ;

- De singes sub-adultes : 11 Mandrills (originaire du Gabon et introduit dans la colonie à partir de 1980) 11 macaques fascicularis, 11 macaques rhésus, 11 babouins, 10 chimpanzés et 10 vervets.



### **1.1.2 L'infection expérimentale**

Sept mandrills sub-adultes, tous nés au Centre de Primatologie du CIRMF ont été choisis parmi les SIV-/STLV-, dont 5 mâles d'âge moyen 7 ans et de poids moyen 14,9 kg (16E, 16D, 12C2, 2C2 et 12A4) et 3 femelles d'âge moyen 7 ans et de poids moyen 7,7 kg (2I, 10G, et 5H). Ces animaux ont été gardés en enclos.

La femelle mandrill 17 originaire du Gabon, a été retenue à cause de sa seule séropositivité en SIVmndGB1, et dans le but de réaliser l'infection expérimentale du 16E. Nous avons effectué à partir de son sérum, un contrôle de séropositivité en ELISA (Genelavia mixt I/II Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr) et Western-blot (New Lav Blot VIH 2.2 Genelabs diagnostics, Singapour).

## **1.2- Stock viral**

### **1.2.1 Pour les infections *in vitro***

Nous avons réalisé le stock viral à partir de 3 mandrills (13, 14, 15) mâles sub-adultes naturellement infectés par SIVmnd-2. Les PBMC des mandrills séropositifs ont été isolés du sang total en utilisant un gradient de densité sur ficoll, puis stimulés avec de la Con A et cocultivés avec des PBMC de mandrills séronégatifs. Les surnageants de culture ont été testés en antigène p27. Les surnageants positifs ont été titrés sur des PBMC de mandrills séronégatifs, puis stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . 3 stocks viraux ont été obtenus, dont les titres sont les suivants:

- Mnd 13:  $5,6 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>
- Mnd 14:  $5,6 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>
- Mnd 15:  $5,6 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>

Le surnageant du Mnd 15 a été retenu pour réaliser les infections *in vitro*

### **1.2.2 Pour les infections *in vivo***

Afin de réduire la variabilité de réponse immunoblastique individuelle et afin de disposer d'une souche virale multipotente, nous avons décidé d'effectuer les infections expérimentales avec un stock de plasma infectieux prélevé au pic de la primo-infection.

Pour ce faire le mandrill mâle 16E séronégatif a été choisi afin de réaliser la première infection expérimentale avec du sang total du mandrill 17 en vue de la préparation du stock.

Les mandrills sont prélevés sous anesthésie générale par la Kétamine, en raison d'une dose de 0,1 ml/ kg.

Avant l'infection 7 ml de sang total du mandrill 16E sont prélevés sur EDTA. Le plasma extrait de ce sang est clarifié 10 minutes à 3500 rpm, aliquoté puis stocké à -80°C et constitue le stock plasmatique négatif. 10 ml de sang du mandrill 17 sont prélevés dans une seringue puis injectés au niveau de la veine fémorale au mandrill 16E.

Au même moment, 7 ml de sang total du mandrill 17 sur EDTA afin de connaître la virémie cellulaire. Les cellules ont été isolées en gradient de ficoll, puis cocultivées avec les Supt 1, en dilution limite et en quadruplicate sur plaque de 24 puits. L'antigène RT a été dosé, puis nous avons déterminé la virémie cellulaire (4 TCID<sub>50</sub>).

Des prélèvements de sang sur EDTA à J0, J4, J7, J11, J14, J17, J21, J28 et J32 sont effectués afin de rechercher les différents marqueurs de l'infection.

#### Dans le plasma :

-Détection des anticorps avec le kit Genelavia Mixt (Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr) et avec la technique ELISA "maison" utilisant des peptides gp41 et V3 spécifiques de SIVmndGb1

-Détection de l'antigénémie avec deux kits commerciaux, Ag-p24 polyclonal (Diagnostic Pasteur) et Ag-p27 monoclonal (SIVp27 Coulter)

-Détection de l'activité RT avec le kit LENTI-RT HS (Cavidi).

-Détection de l'ARN viral par RT-PCR avec les amorces Lenti PolS/U4 puis nesté avec MP5/6 (voir . Chap. Mat. & Méth 4.2).

#### Dans les lymphocytes :

- Détection de l'ADN viral: par PCR ADN avec les mêmes amorces que pour la détection de l'ARN viral (Chap. Mat. & Méth 4.2).

Ce suivi nous a permis de déterminer le pic viral à J10. Le plasma collecté a été aliquoté et stocké à -80°C.

### **1.3- Primo-infection des animaux**

#### **1.3.1 Inoculum**

Le stock viral a été titré sur lignée Sup-T1 et le titre infectieux est de 3000 TCID<sub>50</sub>/ml de plasma. Pour les infections, nous avons utilisé soit 1 ml de plasma titré soit 1 ml du plasma du même mandrill prélevé avant infection et mélangé à 0,8 ml de RPMI tiède. Le transport de ce matériel se fait dans de la glace afin d'éviter une chute brutale de la dose infectieuse.

#### **1.3.2 Animaux**

Avant infection des prélèvements de sang, de ganglions et de lavages broncho-alvéolaires des animaux sont effectués à J-30, J-15, J0. Les déterminations des populations CD4, CD8 a été faite dans le sang et les ganglions lymphatiques. Les lavages broncho-alvéolaires ont été congelés à -80°C

Deux types d'infections sont réalisés :

-L'infection des mandrills séronégatifs témoins 2I et 5H avec du plasma négatif du 16E prélevé à J0.

-L'infection des mandrills séronégatifs 12A4, 10G, 12C2, 2C2 avec du plasma 16E à J10.

Tous les mandrills ont subi des prélèvements réguliers de sang, de ganglions et de liquides broncho-alvéolaires à J0, J4 (uniquement sang), J7, J10, J14, J17, J21, J28 (uniquement sang) , J32 , J60, J180 et J360.

Les outils du suivi de l'infection sont les mêmes que ceux utilisés pour le suivi du 16E.

Par ailleurs, nous avons détecté les anticorps dans le plasma avec le kit Genscreen (Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr) et recherché les marqueurs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sur les PBMC du sang circulant et des ganglions.

A chaque prélèvement, nous avons également noté le poids et la température des animaux.

## **1.4- Prélèvements**

### **1.4.1 Plasma**

A partir du sang total obtenu sur tube EDTA un aliquot de 500µl est mis de côté pour la numération formule sanguine et la vitesse de sédimentation et un aliquot de 100µl est utilisé pour l'analyse des CD4 et CD8.

Le sang total restant est centrifugé à 1400 rpm pendant 5 min. Le plasma est recueilli pour être clarifié à 3000g/min pendant 20 min. Il est ensuite aliquoté en 1 ml puis congelé à -80°C.

### **1.4.2 Cellules du sang périphérique**

Le culot cellulaire après extraction du plasma est déposé sur ficoll afin d'isoler les lymphocytes.

Elles ont été utilisées dans les techniques d'isolement de virus, de titrage cellulaire, de congélation, d'infection cellulaire et de marquage d'antigène de surface CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, elles sont utilisées afin de tester le tropisme de SIVmndGB1. Il s'agit principalement des:

-lymphocytes du sang périphérique (PBL) isolés à partir de sujets VIH négatifs ou de singes séropositifs et séronégatifs. Elles ont été utilisées pour les isolements viraux, les titrages de surnageants et cellulaires, et les études de tropisme cellulaires

-lymphocytes obtenus à partir des ganglions dont une partie a été congelée en DMSO et culot sec, et l'autre utilisée pour le marquage CD4, CD8.

-Les monocytes/macrophages ont été isolés du sang périphérique des singes et humains. Elles ont été utilisées en cultures afin de tester l'infectiosité du SIVmndGB1.

### **1.4.3 Ganglions**

Les ganglions (1ou 2 ganglions) des mandrills ont été obtenus par acte chirurgical sous anesthésie générale, déposé dans du RPMI et transportés dans la glace. Ils étaient, soient poplités, axillaires ou inguinales. Les ganglions sont ensuite disséqués avec du RPMI et

frottés sur un grillage afin de récupérer les lymphocytes. Les lymphocytes ainsi obtenus sont repartis de la façon suivante ;une partie pour le marquage de surface en CD4 et CD8, une autre pour être congelé en DMSO et en culot sec à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **1.4.4 Lavages broncho-alvéolaire (LBA)**

Les LBA sont obtenus toujours sous anesthésie, après ingestion d'un demi-litre de sérum physiologique avec une seringue de 20 cc muni d'une sonde trachéale 3,5, introduit dans les voies respiratoires des singes, et aspiration de ce même liquide qui est recueilli dans des tubes stériles de 50 ml. Les cellules sont recueillies après centrifugation à 1700 rpm, puis congelées en DMSO, tandis que le surnageant est aliquoté et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour l'étude des cytokines.

#### **1.5. Cellules de lignées**

-Cellules de lignées: Molt 4 clone 8, Supt1 et CEMX174, qui sont toutes les trois des lignées  $\text{CD4}^+$  lymphoblastoïdes établies à partir de patients leucémiques, les cellules de lignées promyélonocytaires U937 et les cellules de lignées K562. Elles ont été utilisées pour les isollements viraux, les titrages de surnageants et cellulaires, les études de tropisme cellulaires et comme cibles dans les essais sur la cytotoxicité naturelle.

-Cellules de lignées Ghost exprimant les co-récepteurs CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CXCR4, CCR5, Bob, Bonzo et utilisés dans les études de co-récepteurs du SIVmndGB1.

## **II. Méthodes**

### **1. Techniques sérologiques**

Après un dépistage des sérums par ELISA, au moyen des tests commerciaux (Genelavia Mixt VIH-I/VIH-II, Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr, et Genscreen VIH1/2, Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr) et des tests peptidiques Gp41 et V3 (uniquement pour les mandrills), les sérums ont été testés par Western-Blot afin de confirmer la séropositivité

des singes infectés. Ce dépistage a été suivi d'une quantification de l'antigène p24 et de la RT dans le plasma des mandrills infectés expérimentalement durant la primo-infection.

## 1.1- Technique ELISA

### 1.1.1 Tests commerciaux

Le test Genelavia Mixt VIH-I/VIH-II (Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr) utilisé dans cette étude est de type indirect. Les anticorps anti-VIH, fixés sur les antigènes de la phase solide, sont révélés par des anticorps IgG anti-humains marqués par une peroxydase. Le signal coloré est obtenu après addition d'un chromogène, l'OPD (O-phenilène-diamine, 2HCL). Ce signal est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre qui détermine une densité optique (D.O) approximativement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-VIH du sérum testé.

Le test Genscreen (Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr) est dit de troisième génération car il utilise comme antigène des protéines recombinantes gp 160 et des peptides correspondants à des épitopes immunodominants des glycoprotéines d'enveloppe VIH-1 et VIH-2. Le conjugué est un antigène marqué par une enzyme.

La D.O obtenu pour un sérum testé est interprétée par rapport au seuil de positivité (ou cutoff) de la trousse utilisée.

Une D.O supérieure au cutoff +10%, signe la positivité du sérum testé, alors qu'une D.O inférieure au cutoff -10%, indique la négativité du test. Une D.O égale au cutoff  $\pm 10\%$  est considérée zone grise (ou *borderline*), le sérum est alors retesté. Le calcul des valeurs seuils a été réalisé selon les indications du fabricant.

### 1.1.2 Test peptides SIVmnd gp41 et V3

Les peptides utilisés dans cette technique ont été synthétisés à partir de la séquence SIVmnd GB1 (N°accession M27470) déposé à la Genbank en 1993 par Hayami et *al.*

Les séquences peptides sont :

**V3mnd : NRSVVSTPSATGLLFFYHGLEPGKNLKKG**

**Gp41mnd : TSLENYIKDQALLSQWGCSWAQVC**

Ces peptides sont lyophilisés et purifiés à 80% (NéoSystems, Strasbourg, France)

Les peptides sont dissous dans l'eau à une concentration finale de 1 mg/ml et congelés à -20°C.

Les plaques sont coatés à l'avance selon le protocole suivant:

32 µl de chaque peptide en solution mère à 1 mg/ml sont diluer dans 17 ml de tampon bicarbonate 0.05 M pH 9.6, 100 µl sont déposés dans chaque puits (soit une concentration de 2 µg/ml). Les plaques sont ensuite incubées 18 h à 37°C (emballé dans du papier aluminium), puis lavées 4 fois en tampon PBS, 0.5% Tween 20 (PBS-TW). Les sites non spécifiques sont saturés avec 200 µl de tampon PBS-TW, 2% sérum de veau nouveau-né (PBS-TW-SVNN 2%) par puits. Après une incubation de 45 min à 37°C, suivie de 2 lavages en tampon PBS-TW, les plaques sont égouttées sur du papier absorbant puis congelées à -20°C (emballé dans du papier aluminium).

Les échantillons sont dilués au 1/100 en tampon PBS-TW, 0.75 M NaCl, 10% SVNN (PBS-TW-SVNN10%) et déposés à raison de 100 µl de sérum dilué par puits, puis suivie d'une incubation de 30 min à température ambiante. 100 µl de conjugué Anti IgG marqué à la peroxydase diluée au 1/2000 en tampon PBS-TW-SVNN10% sont déposés dans chaque puits après 4 lavages en tampon PBS-TW, puis incubation comme précédemment.

La révélation se fait après dépôt de 100 µl de substrat peroxide-*o*-phenylendiamine hydrogéné dans chaque puits et arrêt de la réaction après 15 minutes d'incubation à l'obscurité en déposant 50 µl/puits de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

La lecture des D.O. se fait à 492 nm. Un échantillon est positif à partir d'une D.O > 0,20

## **1.2. Technique du Western-Blot**

### **\*Principe**

Les virus utilisés comme source d'antigènes sont obtenus à partir de surnageants de cultures de lignées cellulaires, infectées par un virus VIH. Cette production virale est standardisée et accomplie à grande échelle en vue de la commercialisation des kits utilisés.

Après purification et concentration, les antigènes viraux sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ils sont ensuite transférés électrophorétiquement sur membrane de nitrocellulose.

Les kits commercialisés contiennent des bandelettes découpées à partir de ces membranes de nitrocellulose, sur lesquelles seront mis à réagir les sérums à tester.

Chaque bandelette est disposée dans un rack, de même pour chaque sérum. Les anticorps présents dans le sérum se fixent sur les protéines virales contre lesquelles ils sont dirigés. Ces anticorps sont détectés par des anticorps anti-IgG humaines couplés à de la phosphatase alcaline (conjugué). Après incubation sous agitation et lavage, un substrat de l'enzyme est ajouté dans chaque rack et une dernière incubation révèle la présence des complexes Ac-Ag, visualisés sous forme de bandes colorées correspondant aux différentes protéines ou encore antigènes viraux.

Après lavage et arrêt de la réaction, les bandelettes sont séchées et comparées aux bandelettes de contrôles positifs et négatifs présents dans chaque kit.

Le kit VIH 2.2 (Genelabs Diagnostics, Singapour) a utilisé comme source d'antigène un lysat de virus VIH-1. Il comporte en outre une bande correspondant à un peptide synthétique d'enveloppe VIH-2. Par contre, le kit New Lav blot II a utilisé comme source d'antigène un lysat de virus LAV/VIH-2 seulement.

### **Interprétation des résultats**

Les sérums que nous testons étant des sérums infectés par SIV, et la positivité étant basée sur des réactivités croisées avec des protéines du VIH, nous avons modifié les critères de positivité qui dans le cas de sérums humains demande la présence d'anticorps anti *gag+pol+env*. Ainsi nous avons choisi comme critères;

-Pas de bandes spécifiques; le résultat est considéré comme **négatif**

-2 bandes spécifiques dont au moins une de *gag* et une de *env*, d'intensité égale à celles des bandes de contrôle positif pour SIV ;le résultat est **positif**

-bandes aspécifiques ne correspondant point aux critères de positivité: le résultat est **indéterminé**

## **2. Techniques virologiques**

Elles font toutes appel aux techniques de cultures cellulaires, tant pour la séparation des différentes populations cellulaires que pour l'isolement viral, que pour la détermination des virémies, que pour le titrage de plasmas et surnageants.



## **2.1. Techniques de base de cultures cellulaires**

### **2.1.1 Cultures primaires**

#### **2.1.1.1 Séparation des lymphocytes T**

10 ou 20 ml de sang sont prélevés sur tube EDTA et centrifugés pendant 5 mn à 1400 rpm, à 20°C. Après centrifugation, le plasma est retiré et congelé à -30°C, tandis que le volume de sang restant est dilué dans deux volumes de milieu RPMI 1640. Ce sang dilué est délicatement déposé sur un volume de ficoll paque et centrifugé à 1400 rpm pendant 30 mn à 20°C. L'anneau de PBMC est récupéré et lavé 3 fois dans 15 ml de RPMI 1640, et centrifugé 15 mn à 1400 rpm la première fois, et 10 mn les autres fois à 1400 rpm. Avant la dernière centrifugation, 10µl de suspension cellulaire sont prélevés pour numération sur cellules de malassez, après coloration par 10 µl de bleu Turk's afin de visualiser les cellules vivantes au microscope.

#### **2.1.1.2 Mise en Culture**

##### **2.1.1.2.1 Culture directe des PBMC**

Après le troisième lavage, les lymphocytes sont re-suspendus à une concentration de  $10^6$  cellules /ml dans du milieu normal à 10% ou 20% selon qu'il s'agit des PBMC simiens ou humains, et, stimulés selon la nature des PBMC, avec de la conA ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) pour les PBMC de mandrills ou SEA ( $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pour les PBMC des vervets et torquatus ou PHA ( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pour les PBMC humains, puis incubés à 37°C en atmosphère à 5% de  $\text{CO}_2$ .

##### **2.1.1.2.2 Coculture avec des PBMC**

Compte tenu de la faible croissance des PBMC animaux *in vitro* et des effets cytopathogènes réalisés par les virus en culture direct, les PBMC des animaux infectés ont été mis en coculture. Ces cocultures ont été réalisées dans les buts suivants; (i) faciliter l'isolement des virus, (ii) maintenir la production virale indéfiniment afin d'obtenir un important stock viral.

Elles nécessitent l'isolement et la stimulation des PBMC de sujets animaux ou humains non infectés en milieu normal à 10% ou 20% avec un mitogène approprié. La coculture se fait au 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> jour en mélangeant des PBMC infectées juste isolées et les PBMC non infectés stimulés à une concentration de  $10^6$  /ml dans du milieu complet.

#### **2.1.1.2.3 Coculture avec des lignées**

Dans ce cas, les lymphocytes de l'animal infecté sont stimulés pendant 3 jours. Le mélange se fait alors dans un rapport de 2/1 entre les PBMC simiens infectés stimulés et les cellules de lignées, dans un milieu normal à 10% SVF et à une concentration cellulaire de  $0,5 \cdot 10^6$  /ml.

#### **2.1.2 Entretien des cultures**

Les milieux des cultures cellulaires (PBMC ou lignées) sont changés tous les trois jours. Après centrifugation à 1400 rpm pendant 10 mn, le culot est re-suspendu dans du milieu adapté selon la nature des cellules, à la concentration de  $1 \cdot 10^6$  cellules /ml pour les PBMC et  $0,5 \cdot 10^6$  cellules /ml pour les lignées cellulaires. Rappelons que la composition du milieu en IL-2 et SVF varie selon qu'il s'agit de PBMC humain, de PBMC animal ou de lignées (sans IL-2). La culture est incubée à 37°C en atmosphère CO<sub>2</sub> à 5% pour les PBMC et sans CO<sub>2</sub> pour les lignées. Les milieux sont renouvelés de façon périodique, tous les 3 ou 4 jours et le surnageant est conservé à - 80°C afin de rechercher le virus pour les cultures virales et de constituer un stock de virus infectieux.

### **2.2. Congélation et décongélation des cellules**

#### **2.2. 1 Congélation**

Les PBMC ont été congelés dans différents objectifs:

- conservation des PBMC en DMSO pour cultures ultérieures. Après la dernière centrifugation à 1400 rpm pendant 10 mn, les cellules sont re-suspendues à la concentration cellulaire de 2 à  $4 \cdot 10^7$  cellules /ml dans le milieu de congélation contenant 90% de SVF et

10% de DMSO (**Annexes**). Les cellules sont placées à -80°C dans une cryo-boîte pendant une nuit puis en azote liquide le lendemain.

- conservation en culot sec pour biologie moléculaire. Après la dernière centrifugation à 1400 rpm pendant 10 mn, on vide le surnageant et le culot est conservé à -80°C. Ce culot de PBMC permettra la détection par PCR du provirus intégré dans l'ADN des cellules infectées .

### **2.2. 2 Décongélation**

Les cellules congelées en DMSO sont décongelées rapidement au bain-marie à 37°C, en arrêtant avant que le dernier petit morceau de glace soit fondu complètement. Puis, le contenu est re-suspendu dans du milieu de base à 20% de SVF pour diluer le DMSO. Après centrifugation à 1400 rpm pendant 5 mn, les cellules sont comptées puis re-suspendues doucement en milieu de croissance.

## **2.3. Isolement des virus SIV**

### **2.3.1 Culture directe**

Les PBMC sont isolées, mis en culture directe, stimulées et régulièrement suivies selon les méthodes décrites ci-dessus (Chap. Mat. & Méth 2.1.1/2.1.2). Dès l'apparition éventuelle de syncytia et une diminution de la croissance cellulaire dû à l'effet cytopathogène de certaines souches virales, des PBMC simiens non infectées et stimulées depuis 3 jours dans le milieu complet 10% (avec IL-2), sont ajoutées une fois toutes les deux semaines afin de maintenir la production virale. La production virale est mise en évidence par mesure de l'antigène p27 (Kit Ag-p27 SIV, Coulter), l'antigène p24 (Kit Ag-p24, Sanofi) et/ou de l'activité transcriptase inverse (Chap. Mat. & Méth 2.4.1/2.4.2/2.4.3) dans les surnageants de culture. Les surnageants des cultures positives sont alors aliquotés et conservés à -80°C. Ils constituent une source de virus infectieux.

### **2.3.2 Cocultures avec des PBMC**

Afin d'augmenter les chances d'isolements des SIV, des cocultures sont réalisées. Les PBMC des animaux infectés sont mis en coculture, soit avec des PBMC simiens non infectés de la même espèce, soit avec des PBMC humains comme sus décrit (Chap. Mat. & Méth.

**2.1.1.5).** Trois jours avant la coculture, ces PBMC simiens ou humains doivent avoir été stimulées avec un mitogène approprié dans le milieu complet 10% SVF, ou 20% SVF (**Annexes**) selon qu'il s'agit de PBMC simiens ou humains.

### **2.3. 3 Cocultures avec des cellules de lignées**

Des cocultures avec des lignées cellulaires continues (CEM X174, SupT 1, Molt 4 clone 8), ont été réalisées selon les méthodes sus décrites (Chap. Mat. & Méth **2.1.1.5**). Après 3 jours de stimulations par le mitogène, les PBMC infectés sont cocultivés avec des cellules de lignées. En absence d'IL2 dans le milieu, les PBMC sont progressivement éliminés de la culture, et seuls les cellules de lignées sont productrices de virus. Cependant ce procédé présente l'inconvénient de sélectionner les variants viraux qui s'adaptent à la lignée cellulaire utilisée. Le virus ainsi produit n'est pas forcément représentatif de la population présente *in vivo*. Aussi n'est-elle utilisée que pour la mise en évidence du virus dans les lymphocytes du sujet lorsque l'isolement est difficile et non pour la caractérisation des virus.

## **2.4. Méthodes de détection du virus dans le plasma et les surnageants de cultures**

### **2.4.1 Dosage de l'antigène p27**

Les protéines de core p27 de SIV sont recherchées par une technique immunoenzymatique; Kit de détection d'antigène viral P27 SIV (Coulter™ SIV core Antigen Assay).

-200µl de surnageant de culture ou de plasma sont déposés dans des puits coatés en anticorps monoclonaux murin anti-p24, contenant un tampon de lyse. La plaque est incubée à la température ambiante (20-30°C) pendant une nuit. Si les protéines de core recherchées sont présentes, elles se fixent à l'anticorps monoclonal.

-200 µl d'une solution contenant un anticorps anti-SIV biotinylé, est ajouté après rinçage de la solution contenue dans chaque puits. Une nouvelle incubation est réalisée à 37°C pendant une heure.

-200 µl de streptavidine conjugué à la peroxydase sont ajoutés après rinçage des puits. La présence de la peroxydase fixée au complexe streptavidine-biotine-Ac-Ag est révélée après rinçage et incubation en présence d'un substrat chromogène, la tetraméthylbenzidine (TMB).

Le complexe forme un produit coloré dont l'intensité est proportionnelle au nombre de molécules d'antigènes présentes dans les surnageants de culture.

-Le résultat est donné par spectrophotométrie. Les contrôles positifs et négatifs définissent les normes de validité de la technique et la valeur seuil, égale à la moyenne des contrôles négatifs, est calculée. Tout échantillon ayant une valeur de densité optique supérieure ou égale à la valeur seuil est considérée comme positif.

#### **2.4.2 Dosage de l'antigène p24**

Elavia Ag I (Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fr) est une méthode « sandwich » immunoenzymatique pour la détection des antigènes associés au virus VIH-1, dans les surnageants de culture ou dans les fluides biologiques (sérum, plasma).

Ce test met en œuvre des anticorps polyclonaux sélectionnés sur la base de leur capacité à se lier aux différentes protéines constitutives du virus VIH-1 (protéines internes et protéines externes).

La mise en œuvre du test comprend les étapes suivantes:

-Les échantillons à étudier, ainsi que les sérums de contrôle sont distribués dans les cupules sensibilisées des microplaques. Si des antigènes viraux (VIH-1 Ag) sont présents, ils se lient aux anticorps fixés sur la phase solide.

-Des anticorps polyclonaux anti-VIH-1, marqués à la biotine sont ajoutés. Ils se lient à leur tour aux antigènes viraux retenus par la phase solide.

-Le conjugué (streptavidine-peroxidase) est ajouté après élimination de l'excès d'anticorps biotinylé.

-La présence de l'enzyme immobilisée sur les complexes est révélée par incubation en présence du substrat après élimination de la fraction de conjugué restée libre.

-Après l'arrêt de la réaction, la lecture s'effectue au spectrophotomètre à 492-620 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon.

#### **2.4.3. Mesure de l'activité transcriptase inverse**

##### **\*Principe**

La trousse *Lenti-RT* mesure l'activité de la RT dans un échantillon. La procédure est en deux étapes, la réaction RT et la quantification du produit.

La RT dans l'échantillon synthétise l'ADN. On incorpore du tri-phosphate de Bromodeoxyuridine (BrdUTP) contenu dans le mélange de réactifs dans la matrice/amorce immobilisé.

L'incorporation du BrdUMP est quantifiée par un RT Produit Traceur (anticorps qui se lie au BrdU et conjugué à de la phosphatase alcaline). L'activité de la phosphatase alcaline du traceur est mesuré par colorimétrie et est proportionnelle à l'activité de la RT dans l'échantillon

**\*Concentration des particules virales dans le plasma:**

Pour détecter les particules virales dans le plasma, 200 µl sont ultracentrifugés pendant 10 mn à 100.000 rpm et à 4°C (centrifugeuse TL100 Beckmann). Les particules virales sont ainsi concentrées et le culot viral est lysé après retrait de la phase liquide, dans 20 µl de tampon de lyse du kit SIVp27 (Coulter), afin d'éclater le virus et de libérer la transcriptase inverse.

**\*Transcriptase inverse:**

Le lysat obtenu après centrifugation et les surnageants de culture sont ensuite déposés en raison de 10 µl par puits de la plaque RT, en même temps que le standard dilué (recombinant du VIH-1) selon le protocole indiqué par le fabricant.

**2.5. Technique de virémie quantitative par coculture**

Elle a pour but de déterminer la charge virale cellulaire de l'animal.

**\* Principe:**

Des dilutions croissantes de PBMC infectés sont cocultivés avec les cellules qui se sont montrées permissives au virus lors des cultures, dans des plaques de 24 puits. Les cocultures sont suivies périodiquement tous les trois jours. A J7, J14 et J21 les surnageants sont testés afin de rechercher la présence de l'antigène p24 des virus et /ou de la RT.

**\* Technique:**

Après séparation des lymphocytes sur ficoll, et suite à la dernière centrifugation, le culot de PBMC à tester et celui des cellules permissives sont repris dans du milieu normal 10% ou 20%, suivant l'origine des cellules utilisées (PBMC humains-milieu complet 20%, cellules de lignées milieu normal 10%). La concentration est de  $2.10^6$  cellules/ml lorsque les

PBMC à tester sont cocultivés avec les PBMC humains. Elle est de  $1.10^6$  cellules/ml lorsque les PBMC à tester sont cocultivés avec les cellules de lignées.

A partir de la suspension cellulaire à tester, 5 dilutions de raison 5 sont réalisées, soit 0,6 ml de cellules additionnées de 2,4 ml de milieu.

2 ml de chacune des 6 suspensions cellulaires préparées sont déposés dans une plaque de 24 puits, à raison de 0,5 ml par puits, soit 4 puits par dilution de cellules à tester. Les 4 premiers puits, ayant reçu  $1.10^6$  cellules à tester sont additionnées de 0,5 ml de la suspension de PBMC de donneur séronégatif (soit  $1.10^6$  cellules). Tous les autres puits suivants sont additionnés de 1 ml de la même suspension cellulaire, soit  $2.10^6$  cellules pour les PBMC, soit  $10^6$  pour les lignées.

Les plaques sont incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  en atmosphère 5% de  $\text{CO}_2$ .

Les surnageants sont maintenus en culture pendant 21 jours. Tous les 3 ou 4 jours, les surnageants de chaque puits sont récupérés individuellement et les puits sont additionnés de milieu frais.

Afin de détecter la présence de virus, le contenu en antigène RT des surnageants prélevés au jour + 14, après l'infection, est mesuré à l'aide d'une technique ELISA (Chap. Mat. & Méth 2.3.3). Pour confirmation on teste les surnageants prélevés au jour + 21.

Le titre en virémie cellulaire des cellules à tester est exprimé en "Dose infectieuse pour 50% de la culture cellulaire " pour  $1.10^6$  cellules à tester (TCID<sub>50</sub>/10<sup>6</sup> de cellules). Il correspond à l'inverse de la dernière dilution qui induit une production virale dans 2 puits sur 4 calculé d'après la méthode Spearman et Kärber. On utilise la formule suivante: Log du titre en TCID<sub>50</sub>/ ml = L + d(S - 0,5)

L = log de la première dilution testée

d = log du facteur de dilution

S = somme des rapports des puits positifs

## **2.6. Technique de titrage d'un stock de SIV sur lignée**

Elle a pour but de déterminer le titre infectieux du plasma ou d'un surnageant de culture de l'animal infecté par SIV.

### **\* Principe:**

Des dilutions croissantes de plasma infecté ou de surnageants de cultures sont cultivés avec des cellules permissives au virus, dans des plaques de 24 puits. Les cultures sont suivies

périodiquement tous les trois jours. A J7, J14 et J21 les surnageants sont testés afin de rechercher la présence de l'antigène p24 des virus et /ou de la RT.

**\* Technique:**

Les plasmas et les surnageants après amplification du virus, sont aliquotés et titrés:

Des dilutions de raison 10 du virus (soit plasmatique ou de surnageant) à titrer sont réalisées en milieu normal, à froid. 1 ml de chaque dilution est inoculé sur un culot de  $4 \cdot 10^6$  de lignées. Les cellules inoculées sont incubées 1 à 2 heures à 37°C.

Après l'absorption virale, l'inoculum résiduel est ôté et les cellules sont lavées deux fois avec du RPMI à 1500 rpm.

Chaque culot de cellules est remis en suspension dans 4 ml de milieu normal, puis les cellules sont distribuées dans une plaque de 24 puits à raison de 1 ml de suspension par puits. Les plaques sont incubées à 37°C en atmosphère 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules sont maintenues en culture pendant 14 jours. Tous les 3 ou 4 jours les surnageants de chaque puits sont récupérés individuellement et les puits sont additionnés de milieu frais.

Afin de détecter la présence de virus, le contenu en antigène RT des surnageants prélevés au jour + 6, après l'infection, est mesuré à l'aide d'une technique ELISA (Chap. Mat. & Méth.2.4.3). Pour confirmation on teste les surnageants prélevés au jour + 10.

Le titre en virémie cellulaire des cellules à tester est exprimé en "Dose infectieuse pour 50% de la culture cellulaire " par millilitre d'échantillon (TCID<sub>50</sub>/ ml). Il correspond à l'inverse de la dernière dilution qui induit une production virale dans 2 puits sur 4 calculé d'après la méthode Spearman et Kärber. On utilise la formule suivante: Log du titre en TCID<sub>50</sub>/ ml = L + d(S - 0,5)

L = log de la première dilution testée

d = log du facteur de dilution

S = somme des rapports des puits positifs

## **2.7. Technique d'infection *in vitro* des cellules par SIV**

Les PBMC et les cellules de lignées SupT 1,CEMX-174, Molt 4 clone 8 et U937 ont été infectées par différents SIV des animaux étudiés.



A partir des surnageants de culture des animaux testés, présentant soit une forte antigénémie p24, soit une forte activité de la transcriptase inverse, nous avons infecté un culot de 5 millions de PBMC stimulés ou de lignées par 1 ml de surnageant de culture de chaque animal.

Après une incubation d'une heure à 37°C, suivie d'une centrifugation de 2000 rpm pendant 10 mn, le culot est resuspendu dans 10 ml de milieu normal 10% ou 20%. La culture est incubée à 37°C. Le changement de milieu est effectué tous les trois jours comme sus décrit. Les surnageants sont testés par la mesure de l'activité de la transcriptase inverse (Chap. Mat. & Méth 2.4.3) afin de rechercher la présence de virus.

## **2.8. Technique d'infection *in vitro* des cellules Ghost exprimant les co-récepteurs**

### **\* Mise en culture et entretien**

Les cellules Ghost après avoir été trypsinées, sont lavées tous les trois jours avec du DMEM simple (en congelant la moitié en DMSO), puis re-suspendu à la concentration de  $1.10^6$  cellules/ml avec du milieu complet Ghost (voir Annexes). La culture est incubée à 37°C en atmosphère CO<sub>2</sub> à 5% les lignées Ghost. Les milieux sont renouvelés de façon périodique, tous les 3 ou 4 jours.

### **\*Infection des cellules Ghost**

L'infection s'effectue pour chaque corécepteur, dans une plaque de 24 puits en quadruplicate, et se déroule en trois étapes :

Premièrement la suspension cellulaire est préparée à  $5.10^4$  /ml, puis distribuée à raison de 1ml par puits, dans une plaque de 24 puits. La plaque est ensuite incubée 1 ou 2 jours à 37°C, en présence de 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à l'obtention d'une nappe cellulaire recouvrant 60% du fond des puits.

Après incubation, le surnageant est aspiré, puis remplacé par du milieu complet Ghost neuf pour les cellules exprimant les corécepteurs et du milieu parents Ghost pour les cellules parents n'exprimant que le CD4. Des dilutions virales de raison 5 sont préparées en milieu DMEM, puis distribuées dans les puits en raison de 300µl de chaque dilution en quadruplicate. L'incubation se fait pendant 2 heures à 37°C, en CO<sub>2</sub>. Le surnageant contenant du virus est aspiré, puis remplacé par 1 ml de milieu neuf dans chaque puits. Les plaques sont incubées de nouveau 48 heures à 37°C, en CO<sub>2</sub>.

Les cellules sont suivies par l'observation d'effets cytopathogènes au microscope, et sont maintenues en culture pendant 14 jours. Tous les 2 ou 3 jours les surnageants de chaque puits sont récupérés individuellement et les puits sont additionnés de milieu frais.

Les surnageants prélevés au jour + 4, 7, 11 et 14 après l'infection sont testés par la mesure de l'activité de la transcriptase inverse (Chap. Mat. & Méth 2.4.3) afin de rechercher la présence de virus.

### **3. Techniques d'Immunophénotypage**

Ils ont été utilisés pour déterminer le pourcentage de cellules exprimant le ou les marqueurs de surface. Le pourcentage relatif des différentes sous population de lymphocytes est évalué par immunofluorescence de la membrane viable.

#### **3.1. Sur sang total**

100 µl de sang sont mis en présence de 10 µl d'anticorps monoclonaux CD4 Leu 3A (PE) ou CD8 Leu2A (FITC), pendant 15mn à l'obscurité à température ambiante. La lyse des globules rouges s'effectue avec 2 ml de tampon de lyse, le mélange est incubé après brève agitation dans les conditions identiques à la première étape. Après incubation le lysat est centrifugé pendant 10mn à 1700 rpm, le culot de centrifugation est lavé deux fois avec 2 ml de PBS 1X entre deux centrifugations, puis repris dans 500 µl de PBS. Les cellules marquées sont gardées dans de la glace pillée jusqu'à la lecture au Facscalibur des CD4, CD8 et CD4/CD8.

#### **3.2. Sur PBMC et lymphocytes des ganglions**

Après ficoll, les cellules sont lavées puis re-suspendues dans du RPMI à  $10^6$  de cellules/ml dans chaque cupule. 10 µl d'anticorps monoclonaux CD4 Leu 3A ou CD8 Leu2A sont ajoutés aux suspensions cellulaires, l'ensemble est ensuite incubé dans de la glace, à l'obscurité pendant 20 mn. Après incubation, trois gouttes du mélange 5% de SVF dans du RPMI sont ajoutées dans chaque cupules, la plaque est centrifugée à 160 g pendant 5 mn. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec 4 gouttes du mélange 5% de SVF dans du RPMI, puis re-centrifugées. Les cellules sont finalement re-suspendu avec du PBS1X, plus 1 goutte du

mélange 5% de FCS dans du RPMI et gardé dans de la glace pillé jusqu'à la détermination des CD4, CD8 et CD4/CD8 au Facscalibur.

## **4. Techniques de biologie Moléculaire**

### **4.1. Extraction d'acides nucléiques**

#### **4.1.1 Extraction de l'ADN et de L'ARN viral**

L'ARN est extrait sous sa forme totale. L'ADN proviral est extrait sous sa forme intégrée. Dans les deux cas, la concentration et la qualité de l'ARN ou de l'ADN sont estimées par lecture de la densité optique et après sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Puisque l'ARN et l'ADN extraits sont destinés à une réaction d'amplification (PCR) particulièrement sensible, toutes les étapes sont réalisées dans des pièces où ne sont pas manipulés des plasmides ou de produits PCR afin d'éviter les contaminations. Tous les tampons et le matériel utilisés sont réservés à l'extraction de l'ARN ou de l'ADN. Des cônes à filtres sont utilisés.

#### **4.1.2 Extraction d'ADN par la technique au phénol-chloroforme**

L'ADN proviral SIV est obtenu par extraction de l'ADN génomique des culots de PBMC. Les culots sont repris dans 1ml de tampon de lyse NTE pour 5 millions de cellules. Le tampon de lyse NTE contient 1% de SDS et 50 µl de protéinase K. Bien vortexer et incubé à 37°C à l'étuve pendant la nuit. Le lendemain 500 µl de phénol sont ajoutés après avoir vortexé. Le mélange est vortexé centrifugé 5 minutes à 20°C à environ 14 000 rpm. Sur la phase aqueuse obtenue précédemment, on ajoute 500 µl de chloroforme et l'on centrifuge comme précédemment. L'ADN est précipité avec 2,5 ml d'éthanol absolu froid (conservé à -20°C et 100 µl d'acétate de sodium à 3 M (conservé à 4°C), puis lavé à l'éthanol 70%. L'ADN est conservé à -20°C.

### **4.1.3 Extraction de plasmides**

Les plasmides extraits proviennent du clonage réalisé en vue d'obtenir un standard pour les quantifications de l'ARN plasmidique. L'extraction est réalisée selon la procédure indiquée dans le kit Quiagen plasmid Maxi. Les plasmides ainsi obtenus sont conservés à – 20°C en vue de leur prochaine utilisation.

### **4.1.4 Extraction d'ARN à partir du plasma**

L'ARN des SIV est extrait à partir de 500µl de plasma selon le protocole indiqué dans le Kit QIAamp viral RNA Mini Kit Handbook (Qiagen). Le volume extrait était de 60 µl et l'ARN était conservé à - 80°C.

## **4.2. Amplification génique (PCR)**

La méthode consiste à amplifier spécifiquement une région d'ADN délimitée par des séquences connues à l'aide d'amorces spécifiques et d'une enzyme thermostable, la taq-polymérase (745).

### **4.2.1 Oligonucléotides**

Les couples d'amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier l'ADN virale sont choisis selon les séquences VIH/SIV disponibles dans les banques de données. Des amorces correspondant à des séquences hautement conservées dans les gènes *pol* sont sélectionnées (Tableau. 5). Seules les amorces MP5 et MP6 étaient publiées (162) ces amorces ont été utilisées tout comme POLiS4, POLOR (213), lentipolS et Unipol4 (non publiées) pour l'amplification de séquences SIV<sub>md</sub>.

**Tableau 5 : Amorces SIVmnd-1**

Noms	localisations	spécificité	Séquences 5'-3'
MP5 sens	2942/2965	SIVmnd	CCAGATAAGTGGAAGATAGAAAAG
MP6 anti-sens	3420/3441	SIVmnd	GGGAGATATGGGAAGATTGGTG
POLiS4 sens	4102/4125	SIV/VIH	CCAGCNCACAAAGGNATAGGAGG
POLOR antisens	4904/4926	SIV/VIH	GAAAGGDGAAGGNGCRGTVGT
Lentipol S sens	4802/4821	SIV/VIH	TNDDNCARTACATGGAYGA
Unipol 4 anti-sens	4905/4927	SIV/VIH	TGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGT
MP2 sens	2901/2923	SIVmnd	AGAAAGAACCTCCCTTTCATTGG
MP3 anti-sens	3429/3451	SIVmnd	GGGAAGATTGGTGGCATGAGTAT

#### 4.2.2 Réactions d'amplification

Les conditions optimales sont définies en comparant les données obtenues avec des concentrations croissantes à partir des instructions du fabricant du kit PCR (Boehringer Mannheim), d'amorces, de dNTP et de taq, et en faisant varier les températures d'hybridation et le nombre de cycles d'amplification. La composition du mélange réactionnel par réaction correspondant aux conditions optimales est la suivante : 5µl Tampon 10X, 0,4µl DNTps, 1µl de chaque amorce, 0,2µl de taq et 5µl d'ADN dans un volume final de 50µl.

Les échantillons sont soumis à 35 cycles d'amplification. L'étape de dénaturation est de 30 s à 94°C (2 min pour le premier cycle), l'étape d'hybridation de 30 s à 55°C et l'étape d'élongation de 30 s à 72°C (3 min lors du dernier cycle).

La réaction étant sensible, des précautions particulières sont prises pour éviter toute contamination éventuelle par de l'ADN viral. Ainsi, la préparation du mélange réactionnel et le traitement des produits d'amplification est réalisée dans des pièces différentes. De plus, différents témoins négatifs et positifs sont inclus dans chaque série d'amplification, tel que le mélange réactionnel avec de l'ADN de cellules non infectées.

#### 4.2.3 PCR « nichée »

Cette méthode permet d'augmenter la sensibilité de la PCR. Elle a été utilisée pour obtenir de l'ADN proviral à partir des PBMC des animaux infectés par SIVmnd-1.

5µl du produit de la première PCR sont prélevés et soumis à une deuxième PCR dans un mélange réactionnel qui contient un couple d'amorces homologues à des séquences localisées à l'intérieur des séquences amplifiées lors de la première PCR.

Etant donné la grande sensibilité de cette technique, une pièce séparée est réservée à la manipulation des produits d'ADN issus de la première PCR. Des témoins négatifs supplémentaires sont inclus.

#### **4.2.4 Construction du standard externe**

La construction a nécessité deux étapes; l'une concernant la clonage du produit PCR avec le kit Topo TA Cloning (Invitrogen) selon les instructions du fabricant et l'autre consiste à transcrire le plasmide ainsi obtenu afin d'obtenir le standard ARN nécessaire à la quantification des ARN viraux des échantillons.

##### **\*Clonage du produit PCR**

Le produit obtenu après une PCR avec les amorces MP5 et MP6 est cloné dans le plasmide pCR2.1 topo. Aux 4 µl du produit PCR mis dans un micro-tube à centrifuger, sont ajoutés 1 µl de solution salée (1,2M NaCl ; 0,06 M MgCl<sub>2</sub>). Le volume est ensuite ajusté à 5 µl par addition d'eau stérile, puis complété avec 1µl du vecteur TOPO pour un volume final de 6 µl. Le mélange est doucement vortexé puis incubé 5 min en température ambiante. Après incubation, le mélange réactionnel est mis dans la glace pillée.

2 µl de la réaction de clonage sont ensuite introduits par réaction chimique dans un tube contenant (One Shot Chemically competent *E. coli*) des bactéries compétentes et vortexé doucement. Le mélange est incubé dans de la glace pilée pendant 30 min, puis mis dans un bain-marie à 42°C durant 30 s, pour réaliser un choc thermique afin d'incorporer les plasmides dans les bactéries et ensuite immédiatement remis dans la glace. 250 µl de milieu SOC préalablement acclimaté à la température ambiante sont ajoutés. Les micro-tubes sont refermés puis agités horizontalement à l'aide d'un agitateur à 200 rpm pendant 1 heure à 37°C. 10 à 50 µl de chaque transformation sont étalées sur pétri contenant 40 mg/ml de X-gal, 50 µg/ml d'ampicilline. Une fois que le liquide a été absorbé dans l'Agar, incuber toutes les boîtes de Pétri en position inversée à 37°C. Une réaction de clonage efficace produira 100 colonies. La présence de X-gal dans l'Agar permet de sélectionner les colonies de bactéries contenant un plasmide avec un insert selon leur couleur blanche. Environ une dizaine de colonies blanches ou bleues claires sont analysées, après extraction des plasmides

ADN (par la méthode Qiagen plasmid Maxi kit), par digestion en utilisant des enzymes restrictives *EcoR* I. Les sites reconnus par cette enzyme de restriction sont situés dans le polylinker du plasmide, mais sont absents en principe dans le fragment d'ADN de SIVmnd amplifié. Les plasmides extraits sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **\*Transcription du plasmide *in vitro***

Cette transcription nécessite au départ une amplification par les amorces T7 sens et anti-sens de la région juste avant l'insert du plasmide. L'amorce 5' contient une région T7 à partir de laquelle les produits PCR sont transcrits *in vitro*. Le mélange réactionnel est composé en suivant le protocole HotStarTaq DNA Polymerase (Quiagen) ; Tampon 1X, 200  $\mu\text{M}$  de chaque dNTP, 300 nM d'amorces T7 sens et antisens, 2,5 UI/réaction de taq Hot Star et 1  $\mu\text{g}$  de Plasmide. L'amplification est effectuée dans les conditions optimales suivantes ; les échantillons sont soumis à 45 cycles d'amplification. L'étape de dénaturation est de 15 min à  $94^{\circ}\text{C}$  pour le premier cycle et de 30 s à  $92^{\circ}\text{C}$  pour les cycles suivants, l'étape d'hybridation de 1 min à  $66^{\circ}\text{C}$  et l'étape d'élongation de 1 min à  $72^{\circ}\text{C}$  (10 min lors du dernier cycle).

Une partie des produits PCR est transcrit en ARN, l'autre partie est conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour une transcription ultérieure. Les produits PCR résultant de la PCR avec les amorces T7 sont purifiés selon le protocole indiqué dans le kit Quiagen (PCR purification Kit Qiagen, Courtaboeuf, France). Aux 2  $\mu\text{l}$  de produits PCR purifiés sont ajoutés selon le protocole de transcription fourni par le Mega script T7 kit (Ambion); 2  $\mu\text{l}$  d'ARN polymérase, 2  $\mu\text{l}$  de tampon 10X, 8  $\mu\text{l}$  de Dntp et de l'eau pour un volume final de 20  $\mu\text{l}$ . Le mélange est ensuite incubé 2 heures à l'étuve. Le mélange est de nouveau incubé 30 min en présence de Dnase, qui est par la suite inactivé pendant 5min à  $75^{\circ}\text{C}$ . L'ARN résultante est nettoyé sur mini colonne de résine avec le kit Chroma Spin-30 (Clontech, Palo Alto, CA), puis conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3. Quantification par RT-PCR**

La RT-PCR étant une méthode très sensible pour détecter le nombre de copies ARN dans chaque échantillon, nous avons réalisé des dilutions sériées de raison 5 de nos ARN extraits ( $5^{-1}$ ,  $5^{-2}$ ,  $5^{-3}$ ,  $5^{-4}$ ,  $5^{-5}$ ,  $5^{-6}$ ,  $5^{-7}$ ,  $5^{-8}$ ,  $5^{-9}$ ,  $5^{-10}$ ). Par ailleurs pour déterminer la sensibilité de notre technique, une série de dilution du standard de raison 100 a été réalisée, tout en rétrécissant la dilution au cinquième autour du dernier point positif qui était de 250 copies

après amplification. La quantification par RT-PCR a nécessité deux étapes en une seule réaction.

Les conditions optimales ont été celles du fabricant du kit One step RT-PCR (Qiagen), et en faisant varier la température d'hybridation et le nombre de cycles. La composition du mélange était (volume par réaction) ;10 µl de Tampon 5X, 2 µl de mélange dNTP, 3 µl d'amorces MP5 sens et MP6 antisens, 2 µl d'enzyme, 1/100<sup>ème</sup> du volume final et en fonction de l'ARN et pou un volume final de 50 µl, 5 µl de chaque dilution de Plasmide ont été ajoutés et 20 µl d'ARN de chaque dilution d'échantillons.

Les échantillons sont soumis à une transcription inverse à 50°C pendant 30 s suivis d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 min L'amplification est effectuée dans les conditions optimales suivantes 47 cycles d'amplification avec une étape de dénaturation de 45 s à 92°C, une étape d'hybridation de 45 s à 55°C et l'étape d'élongation de 1 min à 72°C (10 min lors du dernier cycle). Les produits PCR sont analysés sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium.

#### **4.4. Détection des produits d'amplification**

En fin de réaction enzymatique les fragments d'ADN amplifiés sont séparés sur gel d'agarose et visualisés sous un rayonnement d'ultraviolet après coloration au bromure d'éthidium. L'analyse est effectuée selon la PCR réalisée. Pour les amplifications de SIVmnd la bande recherchée de 476 paires de bases, est analysée par rapport à la taille du fragment du témoin positif de même taille et au marqueur de poids moléculaire. Les analyses de bandes obtenues après RT-PCR sont fonction non seulement de la taille recherchée, mais aussi de l'intensité de la bande. La sensibilité est déterminée en considérant de la dernière bande visible sur gel à la fois pour le standard et les échantillons. Le nombre de copies d'ARN par ml de plasma est obtenu selon le calcul suivant ;

Nombre de copies ARN / ml de plasma = A \* B\* 6

**A** = sensibilité du standard (nombre de copies connues)

**B** = sensibilité de l'échantillon

**6** = facteur de dilution





RÉSULTATS

**Première partie :**

**Etudes préliminaires à la thèse ;**

**Caractéristiques biologiques et infections SIVmnd chez les**

**mandrills**

## RESULTATS

### 1. Caractérisation des paramètres biologiques du *Mandrillus sphinx* du CDP

Pour la première fois le mandrill est utilisé comme modèle afin de comprendre la pathogenèse du SIDA en phase de primo-infection. Pour cela, nous nous sommes penchés sur l'étude des paramètres hématologiques et caractéristiques immunologiques susceptibles d'être modifiés au cours de l'infection VIH chez l'homme, sur différentes espèces indemnes de toute infection. Cette étape a eu pour but principal d'établir des valeurs biologiques de comparaisons entre espèces afin de mieux apprécier les modifications au cours de l'infection des mandrills par SIVmnd en phase aiguë.

L'étude des paramètres hématologiques et biochimiques de base (Tableaux 6 et 7) a été effectuée sur 136 mandrills adultes du CDP maintenus en captivité et âgés entre 6 et 8 ans. Nous avons comparé les valeurs biologiques des mandrills non infectés (non positifs en SIV, VIH, STLV, arboviroses) à celles des mandrills infectés par SIV et/ou STLV.

Ces résultats ne montrent aucune différence significative dans les valeurs biologiques, d'une part entre les mâles et les femelles non infectés, d'autre part entre les mandrills infectés et les non infectés.

**Tableau 6 : Valeurs hématologiques chez les mandrills en captivité (A) non infectés (B) infectés par SIVet/ou STLV.**

(A) Hématologie	Femelles			mâles		
	moyenne	écartype	nb Val	moyenne	écartype	nb Val
GR( $10^{12}/l$ )	4.70	$\pm 0.48$	44	4.75	$\pm 0.46$	134
GB( $10^9/l$ )	11.78	$\pm 3.92$	44	9.95	$\pm 3.69$	134
plaquette( $10^9/l$ )	320.41	$\pm 82.75$	22	311.51	$\pm 95.19$	69
hemoglobinemie(g/dl)	11.00	$\pm 0.90$	44	11.12	$\pm 0.88$	134
hematocrite(%)	34.65	$\pm 4.33$	44	34.65	$\pm 3.71$	134
CCMH(g/dl)	32.35	$\pm 3.33$	29	32.29	$\pm 3.51$	90
VGM(fl)	73.90	$\pm 5.72$	44	73.13	$\pm 4.85$	134
TCMH(pg)	23.69	$\pm 1.88$	29	23.47	$\pm 1.74$	90
lymphocyte(%)	51.02	$\pm 20.11$	42	55.86	$\pm 17.86$	134
monocyte(%)	3.47	$\pm 6.99$	42	3.07	$\pm 3.33$	134
neutrophile(%)	42.78	$\pm 19.45$	42	37	$\pm 17.95$	134
eosinophile(%)	2.38	$\pm 2.14$	42	3.58	$\pm 3.17$	134
basophile(%)	0.12	$\pm 0.33$	42	0.11	$\pm 0.38$	134

**(B)**

<b>Hématologie</b>	moyenne	écartype	nb Val
GR( $10^{12}/l$ )	4.69	$\pm 0.48$	50
GB( $10^9/l$ )	9.41	$\pm 3.48$	50
plaquette( $10^9/l$ )	338.88	$\pm 108.32$	26
hemoglobinemie(g/dl)	11.03	$\pm 1.23$	50
hematocrite(%)	34.86	$\pm 4.07$	50
CCMH(g/dl)	31.90	$\pm 2.44$	29
VGM(fl)	74.33	$\pm 4.64$	50
TCMH(pg)	23.20	$\pm 1.50$	29
lymphocyte(%)	49.44	$\pm 15.82$	50
monocyte(%)	3.94	$\pm 4.36$	50
neutrophile(%)	43.86	$\pm 16.00$	50
eosinophile(%)	2.62	$\pm 2.62$	50
basophile(%)	0.12	$\pm 0.33$	49

**Tableau 7 : Valeurs biochimiques chez les mandrills en captivités (A) non infectés (B) infectés par SIVet/ou STLV.**

<b>(A)</b> <b>Biochimie</b>	<b>Femelles</b>			<b>mâles</b>		
	moyenne	écartype	nb Val	moyenne	écartype	nb Val
créatinine(mg/l)	7.15	$\pm 2.56$	26	7.59	$\pm 1.73$	70
albuminémie(g/l)	48.62	$\pm 3.78$	18	48.77	$\pm 5.01$	60
urée sanguine(g/l)	0.18	$\pm 0.09$	18	0.27	$\pm 0.17$	49
ASAT(g/l)	63.74	$\pm 42.94$	23	65.07	$\pm 53.88$	69
ALAT(g/l)	49.96	$\pm 59.88$	24	53.93	$\pm 52.48$	69
bilirubine totale(mg/l)	7.796	$\pm 8.66$	25	4.57	$\pm 2.62$	71
bilirubine conjuguée(mg/l)	1.99	$\pm 3.47$	17	1.45	$\pm 0.85$	55
glycémie(g/l)	0.61	$\pm 0.17$	6	0.77	$\pm 0.21$	18
protides totaux(g:l)	69.37	$\pm 5.13$	19	69.09	$\pm 4.65$	44
phosphatase alcaline(UI/L)	579.35	$\pm 265.28$	17	779.10	$\pm 365.36$	42
$\gamma$ GT(U/L)	87.93	$\pm 25.21$	15	103.63	$\pm 29.36$	41
triglycéride(g/l)	0.99	$\pm 0.90$	16	0.69	$\pm 0.51$	35

**(B)**

<b>Biochimie</b>	moyenne	écartype	nb Val
créatinine(mg/l)	8.28	$\pm 2.41$	24
albuminémie(g/l)	45.36	$\pm 8.76$	15
urée sanguine(g/l)	0.16	$\pm 0.11$	16
ASAT(g/l)	48.38	$\pm 17.77$	24
ALAT(g/l)	74.29	$\pm 70.00$	24
bilirubine totale(mg/l)	3.79	$\pm 1.80$	24
bilirubine conjuguée(mg/l)	1.02	$\pm 0.82$	21
glycémie(g/l)	0.94	$\pm 0.38$	6
protides totaux(g:l)	69.27	$\pm 6.33$	11
phosphatase alcaline(UI/L)	411.82	$\pm 266.26$	11
$\gamma$ GT(U/L)	81.33	$\pm 29.93$	12
triglycéride(g/l)	0.64	$\pm 0.47$	6

Nous avons par la suite choisi un certain nombre de mandrills afin de caractériser les antigènes de surfaces de leurs cellules. Nous avons utilisé des anticorps monoclonaux pouvant différencier des groupes de cellules humaines (CD) et caractérisé par immunofluorescence à l'aide du Facscalibur (Becton Dickinson), selon la technique décrite au chapitre 3 (Matériel et méthodes). Certains de ces anticorps ont montré une affinité importante sur les cellules de mandrills (Tableau 8) et comparable à celle des autres espèces de singes hébergés dans les mêmes conditions (voir article 1), d'autres ont montré peu ou aucune affinité (Tableau 9).

**Tableau 8 :** Listes des anticorps monoclonaux réagissant avec les antigènes de surface des lymphocytes de mandrill, *Mandrillus sphinx*.

Réactifs	Conjugué	Origine	Réactivité prédominante chez l'homme
CD3 (FN18)	FITC	Immunosource	Tous les lymphocytes T
CD4 (Leu 3a)	PE/FITC	Becton-Dickinson	Antigène CD4
CD4 (OKT4a)	FITC	Ortho-Diagnostic	Antigène CD4
CD8 (Leu 2a)	PE/FITC	Becton-Dickinson	Lymphocytes T cytotoxiques/ suppresseurs sous populations NK
CD20 (Leu 16)	FITC	Becton-Dickinson	Tous les lymphocytes B
CD28 (Leu 28)	PE	Becton-Dickinson	Antigène CD28
CD45RA (Leu 18)	FITC	Becton-Dickinson	Lymphocytes naïfs
CD16 (Leu 11a)	FITC	Becton-Dickinson	Lymphocytes NK
CD56 (NKH1-RD1)	PE	Immunotech	Lymphocytes NK
HLADR (L243)	PE/FITC	Becton-Dickinson	Antigène MHC classe II

**Tableau 9 :** Listes des anticorps monoclonaux réagissant peu ou pas avec les antigènes de surface des lymphocytes de mandrill, *Mandrillus sphinx*.

Réactifs	Conjugué	Origine	Réactivité prédominante chez l'homme
CD3 (sp34)	FITC	Becton-Dickinson	Tous les lymphocytes T
CCR5A	FITC	Ortho-Diagnostic	Antigène CCR5
CCR5B	FITC	Ortho-Diagnostic	Antigène CCR5
CD34 (HPCA-2)	FITC	Becton-Dickinson	Lymphocytes précurseurs
CD45RO	FITC	Becton-Dickinson	Lymphocytes mémoires

## Article 1:

Comparative analysis of Natural Killer cell activity, lymphoproliferation and lymphocyte surface antigens expression in non-human primates housed at the CIRMF Primate Center, Gabon

Poaty-Mavoungou V, **Onanga R**, Yaba P, Delicat A, Dubreuil G and Mavoungou E.

2001. J. Med. Primatol., (30), 26-35

Une étude comparative sur l'activité cytotoxique des cellules dites NK (*Natural Killer*) ou encore cellules tueuses, a été réalisée au Centre de Primatologie. Afin d'évaluer ce compartiment du système immunitaire chez différentes espèces, l'Homme, le babouin, le chimpanzé, les macaques (rhesus et cynomolgus), le vervet et le mandrill, nous avons utilisé le test classique de cytotoxicité NK contre les lignées érythroleucémique humaine K562 et promyélocytaire U937 comme cellules cibles.

Nos résultats révèlent que tous les primates testés dans cette étude, et l'Homme, présentent une activité cytotoxique mesurable. Il apparaît en outre, que l'activité cellulaire cytotoxique NK des macaques rhesus et cynomolgus est plus faible que celle observée chez l'Homme, tandis que le mandrill présente une activité similaire à celle de l'Homme.

Lorsque l'on compare le compartiment des cellules NK des singes entre eux, on s'aperçoit qu'il y a une différence significative entre le mandrill et les macaques d'une part, et le babouin, le chimpanzé et le vervet d'autre part. L'activité cellulaire du mandrill est supérieure à celle des macaques qui est aussi plus élevée que celle du babouin, du chimpanzé et du vervet. Le vervet présente la plus faible activité cytotoxique de toutes les espèces testées dans notre étude.

Des résultats comparables ont été également obtenus en utilisant comme cellules cibles, la lignée promyélocytaire humaine U937. Toutefois, il est nettement observable que les cellules K562 utilisées couramment dans ces tests de cytotoxicité NK, sont plus sensibles à la réponse NK des primates que les cellules U937, pour toutes les espèces analysées. L'analyse phénotypique de différents antigènes de surface a été parallèlement réalisée afin de montrer que la différence d'activité observée entre les différentes espèces

n'est pas liée au nombre de cellules NK produit par chaque espèce de primate, mais reflète bien la réalité de l'activité cellulaire. L'analyse comparative montre qu'il n'y a pas de corrélation positive entre l'activité NK et le pourcentage de cellules exprimant l'antigène CD56 caractéristique des cellules NK. On remarque par exemple que les macaques, rhesus et cynomolgus, avec respectivement  $12,4 \pm 3\%$  et  $14,1 \pm 6\%$  d'expression de CD56 présentent une activité cytotoxique NK supérieure à celle du chimpanzé qui exprime  $16,7\% \pm 2\%$ . De même, le mandrill qui exprime  $12,5\%$  de CD56 a une activité supérieure à celle du cynomolgus.

La différence d'activité observée est donc bien le fait d'une activité cellulaire différente, et ne résulte pas du pourcentage de cellules produit par les différentes espèces étudiées. Le nombre absolu des cellules a été déterminé dans tous les cas et les mêmes ratios cellules effectrices : cellules cibles (E:T) ont été utilisés pour tous les tests de cytotoxicité.

Dans le même ordre d'idée, la comparaison de la lymphoprolifération a été réalisée en utilisant l'indice de stimulation reflet réel de la prolifération cellulaire. Les résultats obtenus suggèrent que les PBMC de mandrill bien que présentant un faible indice de stimulation, inférieur à celui des macaques et du chimpanzé présentent au contraire une activité cytotoxique NK nettement supérieure. La promptitude à la prolifération n'influence pas non plus l'activité cytotoxique NK.

En marge de l'activité cytotoxique NK, cette étude a également montré, en utilisant les anticorps anti-CD4 (Leu2A) et anti-CD8 (Leu3A) que les lymphocytes de vervets expriment, en accord avec les résultats de la littérature, tout à la fois les déterminants CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, ce qui est un élément très important dans le contexte du SIDA qui est caractérisé par l'immunodépression. Le nombre de CD8<sup>+</sup> élevé chez certains animaux ne témoignerait donc pas forcément d'une activité suppressive évidente, mais pourrait cependant expliquer les raisons de la non pathogénicité de l'infection SIV chez les modèles non pathogènes, tel le mandrill. Par la même occasion cette étude nous a permis de constater que certains anticorps monoclonaux croisaient (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA, anti-HLADR, anti-CD34, anti-CD16) avec les CD des mandrills afin d'évaluer les différentes sous populations cellulaires.



# Comparative analysis of natural killer cell activity, lymphoproliferation and lymphocyte surface antigen expression in nonhuman primates housed at the CIRMF Primate Center, Gabon

Poaty-Mavoungou V, Onanga R, Yaba P, Delicat A, Dubreuil G, Mavoungou E. Comparative analysis of natural killer cell activity, lymphoproliferation and lymphocyte surface antigen expression in non-human primates housed at the CIRMF Primate Center, Gabon. J Med Primatol 2001; 30:26–35. © Munksgaard, Copenhagen

**Abstract:** Six different species of nonhuman primates housed at the CIRMF Primate Center, cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), mandrills (*Mandrillus sphinx*), vervets (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*), chimpanzees (*Pan troglodyte*) and baboons (*Papio hamadryas*), were evaluated for their natural killer cell activity and for the ability of their peripheral blood mononuclear cells to proliferate in response to known mitogens (concanavalin A, phytohemagglutinin and staphylococcal enterotoxin A) and to react with a panel of mouse monoclonal antibodies directed against human leukocyte surface antigens. Basic information on normal immune functions in these primates is important because of their use as experimental animal models for the study of human diseases such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), hepatitis, loiasis and malaria.

## Introduction

The use of nonhuman primates as animal models for the study of human diseases has become increasingly important. They are used as animal models for a broad range of disciplines, including immunological studies and drug- and vaccine-development studies against human diseases [3, 9, 30, 38]. The discovery of simian lentiviruses and simian immunodeficiency virus (SIV), with biological properties similar to those of human immunodeficiency virus (HIV) [8, 10, 15, 16, 35, 40, 51, 52] and capable of inducing an acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-like disease in rhesus monkeys, has made the nonhuman primate model important for the understanding of virus-in-

**Virginie Poaty-Mavoungou,  
Richard Onanga,  
Philippe Yaba, André Delicat,  
Guy Dubreuil, Elie Mavoungou**

Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), B.P. 769, Franceville, Gabon

Key words: lymphoproliferation – natural killer activity – nonhuman primates – phenotype

Accepted August 9, 2000.

Dr. E. Mavoungou, Emerging and Re-Emerging Diseases Unit, Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), B.P. 769, Franceville, Gabon.

Present address: Department of Parasitology, Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen, Germany.  
E-mail: eliemavoungou@yahoo.fr

Funding: CIRMF is supported by the state of Gabon and by funds provided by Elf Gabon company and le Ministère Français de Coopération.

duced acquired immunodeficiency diseases. Natural killer (NK) cells comprise 5–15% of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and appear morphologically as large granular lymphocytes; they are defined functionally by their ability to lyse target cells without deliberate prior sensitization [1, 5, 6]. The contrasting properties of NK and cytotoxic T-lymphocyte (CTL) class I receptors provide complementarity in the cytolytic lymphocyte response to viruses, tumors, transplants and intracellular bacterial pathogens. The CD3/T-cell receptor complex is T-cell-restricted and initiates T-cell activation programs, while the killer cell inhibitory receptors (KIRs) expressed on NK cells are involved in the negative control of both NK and T-cell activation [20, 25, 31]. Genes encoding the

murine and human NK cell receptors have been cloned, and studies of their structure, function and expression are progressing rapidly [53]. In contrast to KIRs, killer cell activatory receptor engagement with appropriate major histocompatibility complex (MHC) class I molecules expressed on the target cell surface initiates lymphocyte activation programs, as assessed by the mobilization of intracytoplasmic  $Ca^{2+}$ , by an enhancement of MHC class II-restricted T-cell response and by the induction of target cell lysis [44, 48]. These activatory isoforms of killer cell MHC class I receptors are assembled in a multimeric complex in NK cells [13, 48].

Some studies on the basic immunological parameter in nonhuman primates have been reported [11, 22, 28, 32, 55]; formation on the phenotypic expression of some lymphocytic antigens in primates has been used to establish phylogenetic distances among different species [14, 17, 32, 49] and to compare the ability of different monoclonal antibodies (mAbs) to identify homologous subsets of leukocytes in human beings and in nonhuman primates [39]. NK cells represent an important first line of defense against viral infections, against neoplastic cell growth, and in the control of hematopoiesis [1, 13, 46]. Previous studies have examined the NK cell activity in some primate species (e.g., rhesus monkeys [*Macaca mulatta*] and cynomolgus monkeys [*Macaca fascicularis*]), and the cells responsible for the observed cytotoxicity activity have been, in some instances, characterized [6, 27, 29, 55]. It was reported that the onset of human AIDS correlates with an impairment of NK cell functions [7, 45]. In this study, we evaluate the normal NK cell activity and the proliferative responses of peripheral blood lymphocytes to mitogens to provide normal background values that may be useful when virus-induced alterations of these immunological functions are studied in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), mandrills (*Mandrillus sphinx*), vervets (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*), chimpanzees (*Pan troglodyte*) and baboons (*Papio hamadryas*). We also describe the reactivity of a panel of murine mAbs specific for human leukocytic antigens against peripheral blood lymphocytes obtained from these monkeys. Information on these immune functions in nonhuman primates is therefore important, considering their roles as animal models for the study of potential therapies and vaccines directed toward the control of human retrovirus infections.

## Materials and methods

### Animals

The six species of nonhuman primates used in this study included 11 cynomolgus monkeys, 11 rhesus monkeys, 11 mandrills, 10 vervets, 10 chimpanzees and 11 baboons. The animals were housed at the CIRMF Primate Center (Franceville, Gabon) primate facilities. At the time of the study, all animals tested seronegative for simian T-lymphotropic virus type-I, type-D retroviruses (SRV-1 and SRV-2) and SIV. Serologic tests for two other common viruses in these species, foamy virus and Epstein-Barr virus were also done and were negative. Health volunteers (HIV-seronegative African young people, 20–30 years old) were included as controls (n = 17).

### Culture medium

The culture medium was Roswell Park Memorial Institute culture medium (RPMI)-1640 (Sigma, Deisenhofen, Germany) supplemented with antibiotics (100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 60 µg/ml gentamicin), 2 mM glutamine (all reagents from Gibco, France) and 5% heat-inactivated human AB<sup>+</sup> serum (CNTS, Paris, France).

### Separation of PBMCs

PBMCs were separated on a Ficoll-Hypaque (Sigma) density gradient as previously described [26, 27]. The cells obtained were resuspended in complete medium, which included RPMI-1640 supplemented with 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 M HEPES buffer, 1% nonessential amino acids and 5% heat-inactivated fetal bovine serum (ICN Flow, Fontenay Sous Bois, France).

### Antibodies

The mAbs used were: anti-CD3 anti-human T-cells clone CRIS-7 from Biosource International (Montrouge, France), anti-CD4 (leu3a-FITC), anti-CD8 (leu2a-PE), anti-CD16 (leu11a-FITC), anti-CD28 (leu28-PE), anti-CD45RA (leu18-FITC), anti-CD34-FITC and anti-HLA-DR-PE purchased from Becton Dickinson (Erembodegem, Belgium), anti-CD4 (OKT4a-FITC) from Ortho-Diagnostic (Roissy, France); PE-conjugated anti-CD56 mAb (NKH1-RD1) from Immunotech (Marseille, France).

Table 1. Percentages and absolute counts of cell subsets in the PBMCs from human and nonhuman primates used

mAbs	Species													
	Baboons n = 11		Rhesus monkeys n = 11		Cynomolgus monkeys n = 11		Chimpanzees n = 10		Mandrills n = 11		Vervets n = 10		Humans n = 17	
	% <sup>1</sup>	Abs <sup>2</sup>	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs
CD3 <sup>+</sup>	81.2 ± 2	4,227 ± 712	65.8 ± 9	2,443 ± 9	72.5 ± 11	2,666 ± 412	84.2 ± 7	5,314 ± 315	69.1 ± 6	1,649 ± 120	52.42 ± 2	963 ± 16	74.4 ± 7	1,421 ± 212
CD4 <sup>+</sup>	38.6 ± 3	1,984 ± 125	38.9 ± 4	1,463 ± 79	28.4 ± 6	1,044 ± 214	39.1 ± 2	2,382 ± 110	21.7 ± 4	527 ± 61	22.20 ± 9	407 ± 13	44.1 ± 1	841 ± 71
CD8 <sup>+</sup>	62.3 ± 4	3,205 ± 413	32.4 ± 2	1,219 ± 131	31.5 ± 2	1,149 ± 83	34.4 ± 2	2,123 ± 25	63.9 ± 1	1,503 ± 21	79 ± 2	1,431 ± 22	29.4 ± 4	557 ± 68
CD16 <sup>+</sup>	9.3 ± 6	469 ± 63	10.6 ± 3	418 ± 27	12.3 ± 2	467 ± 15	14.4 ± 6	896 ± 18	10.3 ± 2	241 ± 7	8.16 ± 3	139 ± 11	17.3 ± 4	322 ± 10
CD28 <sup>+</sup>	21.1 ± 4	1,096 ± 92	51.3 ± 9	1,943 ± 212	46.1 ± 5	1,703 ± 67	44.4 ± 3	2,812 ± 216	19.1 ± 9	467 ± 10	34.16 ± 6	636 ± 9	41.3 ± 11	694 ± 93
CD34 <sup>+</sup>	0.64	37 ± 4	0.84	32 ± 2	1.3	44 ± 4	2.5 ± 1	163 ± 11	1.61	35 ± 3	2.2 ± 1	40 ± 6	1.8	31 ± 3
CD45RA <sup>+</sup>	44.2 ± 9	2,309 ± 264	75.8 ± 8	2,840 ± 107	77.3 ± 5	2,789 ± 123	81.4 ± 4	5,129 ± 227	51.7 ± 1	1,254 ± 21	38.42 ± 3	713 ± 12	63.7 ± 7	1,102 ± 104
CD56 <sup>+</sup>	18.4 ± 2	936 ± 44	12.4 ± 3	462 ± 17	14.1 ± 3	511 ± 18	16.7 ± 2	1,049 ± 86	12.5 ± 2	286 ± 13	11.30 ± 4	204 ± 16	14.7 ± 4	144 ± 7
HLA-DR <sup>+</sup>	22.4 ± 1	1,247 ± 162	30.2 ± 6	1,150 ± 102	18.7 ± 4	652 ± 36	15.5 ± 6	969 ± 12	9.6 ± 7	228 ± 7	24.61 ± 2	431 ± 21	37.1 ± 9	721 ± 13

<sup>1</sup>Percentage of positive cells in the lymphocyte gate.

<sup>2</sup>Lymphocytes × 10<sup>6</sup>/ml of peripheral blood.

The values after the ± signs refer to standard error (SE) of the mean. HLA, human lymphocyte antigen

Magnetic beads

Dynabeads M-450 coated with rat anti-mouse IgG1 (Prod. No. 120.01) and Dynal MPC-6, a neodymium magnetic particle separator, (Prod. No. 120.02) were supplied by Dynal, (Compiègne, France).

Cross-reactivity studies

Total leukocyte counts of whole blood were obtained using a Coulter counter (Coulter Electronics, Hialeah, FL). The cells were adjusted to 1 × 10<sup>7</sup> leukocytes/ml in phosphate-buffered saline (PBS) prior to staining. A standard dual-color phycoerythrin (PE) and fluorescein isothiocyanate (FITC) immunophenotyping technique was used [22]. Briefly 100 µl of whole blood (1 × 10<sup>6</sup> leukocytes) was incubated with previously determined optimum volumes of mAbs conjugated to FITC or PE (Table 1). All data were acquired with a FacsCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled argon-ion laser operating at 15 mV and emitting light at 488 nm. Results were compiled as percentages of the lymphocyte gate and as absolute counts (10<sup>6</sup> cells/ml) using the leukocyte count. To produce optimized two-color analysis, daily instrument calibrations were performed using i) Autocomp software with calibrate beads, ii) Quickcal beads and software and iii) QC3 beads. Autocomp is a menu-driven program that adjusts the photoelectric components (gain settings and fluorescence compensation) of the FacsCalibur flow cytometer to known standards using calibrated beads (Becton Dickinson) as its reference standard. The Autocomp program performs three FacsCalibur adjustments: Gating single and fluorescence compensation. The Quickcal kit also uses populations of plastic beads, of which one is unstained and five have differential levels of FITC. Besides gating single events, this program performs statistical analysis on inter-measurement variance (CV) and allows the creation of history files on the analytical performance of the instrument. Finally, the QC3 beads are exclusively used for channel targeting, which permits comparison of fluorescence intensity measurements from day to day.

Isolation of CD56<sup>+</sup> NK effector cells

Highly purified CD56<sup>+</sup> cells were obtained by immunomagnetic isolation as described earlier [33]. Briefly, unseparated PBMCs were isolated from buffy coats by lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway) centrifugation and incubated at 4°C with 0.08 µg anti-CD56 mAb to 10<sup>6</sup> PBMCs. After 45–60

minutes, the cells were washed twice in HBSS (Gibco) and resuspended in complete medium, consisting of complete RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 5% AB (CNTS). Following this,  $7.5 \times 10^5$  Dynabeads/ $10^6$  PBMCs were added and the cells were incubated for 30 minutes at 4°C with gentle rotation. The CD56<sup>+</sup> cells attached to the Dynabeads and were then trapped by a magnet (MPC-6). The cell/bead suspension was incubated in complete medium at 37°C for 16–20 hours, whereupon the beads detached from the cells. The detached beads were removed by the magnet and the CD56<sup>+</sup> cells were subsequently used in the described experiments. Where specified, additional purification of NK cells was obtained by using anti-CD3-coated Dynabeads for depletion of CD56<sup>+</sup> T-cells essentially as described by Naume et al. [33], using  $3 \times 10^6$  Dynabeads/ $10^6$  CD56<sup>+</sup> cells. Additional purification of the immunomagnetic bead-purified populations of NK cells was performed by sorting of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> lymphocyte in the FacsCalibur cell sorter (Becton Dickinson), following their staining with FITC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD56 mAbs. Sorted NK cells were >99% pure CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells.

#### Target cells

K562, a myeloid tumor cell line derived from a patient with chronic myelogenous leukemia in blast phase, and U-937 cell line were used as target in natural cytotoxicity assay [37]. These cells were maintained in complete medium using tissue culture flasks (Polylabo, Strasbourg, France) with half medium changed every second day.

#### Cytotoxicity assays

For NK activity assays, target cells (K562 and U937) ( $1 \times 10^6$ ) were labeled with 100  $\mu$ Ci of <sup>51</sup>Cr (sodium chromate in aqueous solution, from the Radiochemical Centre, Amersham, France; specific activity 250–500 mCi/mg of Cr) in 1.5 ml of complete medium for 18 hours at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Taking into account the decay of <sup>51</sup>Cr, the volumes of radioactive solution added were 80–250  $\mu$ l, depending on the reference date. The labeled cells were washed twice in complete medium and resuspended at  $1 \times 10^5$  cells/ml in complete medium. NK cells obtained from the different species examined were used as effector cells. They were added to target in triplicate wells of round-bottom 96-well microtiter plates at effector:target ratios of 50:1, 25:1, 12.5:1, and 6.25:1 to determine experimental <sup>51</sup>Cr release. Controls in-

cluded triplicate cultures of target cells in assay medium (spontaneous <sup>51</sup>Cr release) and in 1% NP-40 (maximum <sup>51</sup>Cr release). The plates were spun at 200 g for 5 minutes and then incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator for 4 hours. After incubation, radioactivity in 100  $\mu$ l of supernatant fluid was determined with a gamma counter. The percentage of <sup>51</sup>Cr-specific release was determined using the following formula:

$$\frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

Spontaneous release of target cells incubated in the absence of effector cells was always less than 20%. The results were expressed in lytic units. One lytic unit was defined as the number of lymphocytes required for 20% specific <sup>51</sup>Cr release from  $5 \times 10^3$  target cells, as estimated by exponential regression analysis for four effector:target cell ratios [43]. The data were calculated as lytic units per  $10^7$  lymphocytes.

#### Lymphocytic subset characterization

The relative percentages of different subsets of lymphocytes were evaluated by viable membrane immunofluorescence [22, 32]. Murine mAbs directed against human lymphocytic antigens including anti-CD3-FITC clone CRIS-7 (total CD3<sup>+</sup> T-cells), anti-Leu-3a-PE and OKT4a-FITC (helper-inducer CD4<sup>+</sup> T-cells), anti-leu-2a-PE (cytotoxic-suppressor CD8<sup>+</sup> T-cells) and anti-CD56-PE (CD56<sup>+</sup> NK cells). A solution of  $2 \times 10^6$  cells in 50  $\mu$ l of PBS supplemented with 5% human AB<sup>+</sup> serum and 0.1% sodium azide (washing solution) was incubated at 4°C with 20  $\mu$ l of appropriate mAb for 30 minutes. After incubation, the cells were washed twice and fixed in 4% paraformaldehyde for flow cytometric analysis using FacsCalibur (Becton Dickinson). The scatter gate was set on the lymphocyte peak and  $10^4$  cells were counted. The percentage of positive cells was calculated as the percentage of cells that stained more intensively than the threshold defined by the negative control cells (cells without the mAb or cells stained with a combination of irrelevant IgG1-FITC, IgG2a-PE and IgG2b-FITC to evaluate non-specific staining; Simultest control, Becton Dickinson).

#### *In vitro* proliferative responses

Peripheral blood lymphocytes were resuspended at  $2 \times 10^6$  cells/ml in complete medium and cultivated in triplicate wells in flat-bottom microtiter plates in the presence of 1  $\mu$ g/ml concanavalin A (ConA), 1

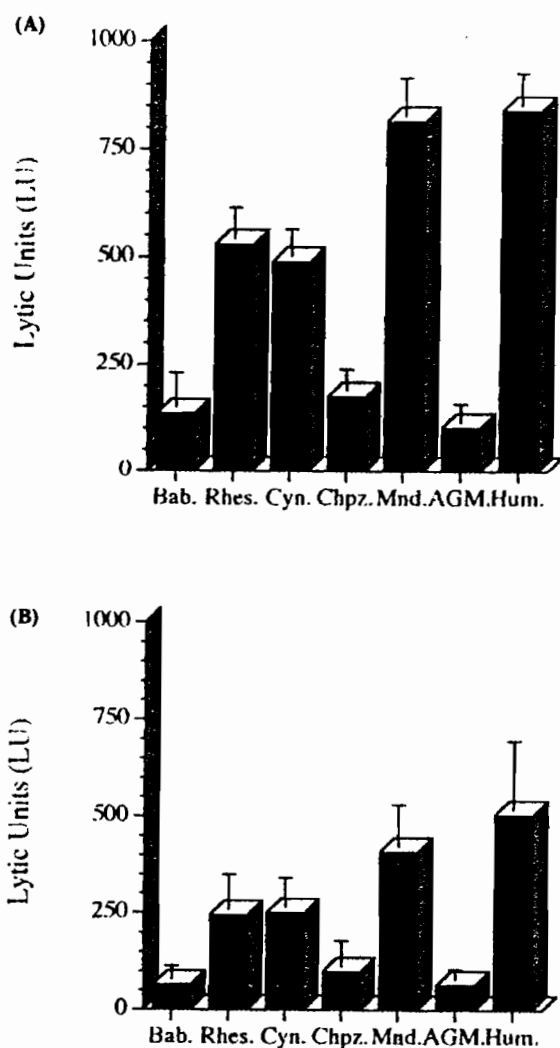


Fig. 1. NK cell activity in baboons (Bab,  $n = 11$ ), rhesus monkeys (Rhes,  $n = 11$ ), cynomolgus monkeys (Cyn,  $n = 11$ ), chimpanzees (Chpz,  $n = 10$ ), mandrills (Mnd,  $n = 11$ ), vervets (AGM,  $n = 10$ ) and human beings (Hum,  $n = 17$ ) using K562 cells (A) or U937 cells (B) as targets. Each histogram represents mean lytic units  $\pm$  standard error (SE) of the mean.

$\mu\text{g/ml}$  phytohemagglutinin (PHA)-p, or 10  $\mu\text{g/ml}$  staphylococcal enterotoxin A (SEA). Cells cultivated in medium alone served as controls. The plates were incubated in a 5%  $\text{CO}_2$ -humidified incubator for 72 hours. After incubation,  $^3\text{H}$ -thymidine was added at 1  $\mu\text{Ci/well}$ , and the plates were incubated for an additional 12 hours. The cells were then collected from the wells onto fiberglass filters using a semiautomatic microharvesting device (Brandel, Gaithersburg, MD) and the amount of radioactivity incorporated was measured in a scintillation counter. The data were expressed either as mean counts per minute from unstimulated or mitogen-stimulated cultures or as a stimulation index calculated by dividing the mean counts-per minute of mitogen-stimulated cultures by the mean counts per minute of unstimu-

lated cultures. Student's  $t$ -test was used to compared mean values.

## Results

### NK cell activity

The NK cell activity in normal healthy human volunteers, baboons, chimpanzees, mandrills, cynomolgus monkeys, rhesus monkeys and vervets was evaluated using the erythroleukemia cell line K562 as target. Among the various species examined, different degrees of NK cell cytotoxicity activity were observed (Fig. 1A). Baboons, chimpanzees and vervets had significantly lower NK activity compared with that of normal human volunteers. The NK cell activity of cynomolgus monkeys and rhesus monkeys was also lower than that of human controls, but the difference was not statistically significant. The NK cell activity of mandrills was identical to that of human controls. When NK cell activity among primates was compared, there was a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the NK cell activity of mandrills, cynomolgus monkeys and rhesus monkeys and those of baboons, chimpanzees and vervets. Similar results were obtained with another NK cell-sensitive human cell line (U937) as target cells in the cytotoxicity assays (Fig. 1B). However, K562 is more sensitive to primate NK cell lysis than U937. When PBMCs obtained from these species were stained with anti-CD56 mAb directed against the surface marker CD56 associated with cells belonging to the NK cell line lineage, there were no significant differences in the relative percentages of cells bearing the CD56 phenotype (Table 1). Although baboon PBMCs showed the highest mean percentage of cells expressing the CD56 surface marker, they displayed a relatively lower NK cell activity compared with those of human, chimpanzee, cynomolgus monkey, rhesus monkey and mandrill PBMCs.

### *In vitro* lymphoproliferation

The proliferative responses of PBMCs to the T-cell mitogens ConA, PHA-p and SEA were evaluated (Table 2). Although all species studies exhibited a proliferative response against these mitogens some differences were noted, particularly between vervets and mandrills. The proliferative capacity of PBMCs from vervets was lower than that of other species when the mean net counts per minute (cpm) (cpm in the presence of mitogen - cpm in the absence of mitogen) were compared and when the data were calculated as a stimulation index in response to PHA-p and ConA. Although the

Table 2. Proliferative response of PBMCs from human and nonhuman primates in mitogen-stimulated cultures

Species	n	PHA-p		ConA		SEA		Controls
		cpm <sup>1</sup>	Stimulation index <sup>2</sup>	cpm	Stimulation index	cpm	Stimulation index	cpm
Baboons	11	16,982 ± 1,204	14 ± 1	9,098 ± 512	7 ± 3	31,469 ± 2,571	25 ± 3	1,213 ± 193
Rhesus monkeys	11	58,590 ± 3,212	126 ± 8	82,770 ± 5,153	178 ± 13	108,234 ± 9,635	232 ± 39	465 ± 74
Cynomolgus monkeys	11	52,635 ± 1,429	89 ± 13	86,515 ± 2,843	143 ± 22	96,380 ± 6,341	159 ± 17	605 ± 46
Chimpanzees	10	29,319 ± 3,132	88 ± 9	37,744 ± 4,563	112 ± 41	53,472 ± 2,413	161 ± 13	337 ± 114
Mandrills	11	102,528 ± 2,096	87 ± 21	31,104 ± 2,105	27 ± 5	120,053 ± 7,953	104 ± 7	1,152 ± 212
Vervets	10	4,685 ± 352	5 ± 2	5,622 ± 611	6 ± 2	99,264 ± 3,361	107 ± 3	937 ± 98
Humans	17	21,545 ± 3,345	15 ± 6	34,464 ± 3,718	24 ± 9	41,358 ± 967	29 ± 7	1,437 ± 217

<sup>1</sup>Counts per minute ± SE of the mean of triplicate cultures.

<sup>2</sup>Stimulation index (SI) ± SE of the mean.

The SI was calculated as follows: SI = incorporation in the presence of mitogen/incorporation in the presence of medium alone.

PHA-induced proliferation of baboon PBMCs was comparable to those of human, cynomolgus monkey and rhesus monkey PBMCs, proliferation in response to PHA-p was lower than those of other species examined. SEA seemed to be more effective in inducing T-cell proliferation in mandrills, rhesus monkeys, cynomolgus monkeys, vervets and chimpanzees than ConA and PHA-p, respectively.

#### Surface antigen characterization

Mouse mAbs directed against human lymphocytic surface antigens react with nonhuman primate PBMCs [11, 32]. These mAbs have been useful in the identification of conserved epitopes on the surface of primate mononuclear cells and in the determination of the phylogenetic relatedness among these species. Because we observed differences in NK cell activity and proliferative responses in the primates studied, we examined the relative percentages of T-lymphocytes and NK cells in the peripheral blood (Table 1). For T-lymphocyte identification, anti-CD3 mAb, which recognizes the CD3 determinant, was used; CD3 is conserved among primates. CD4<sup>+</sup> lymphocytes co-express CD4 antigen and CD45RA isoforms. CD45RA naïve T-cells are highly conserved among primates.

#### Co-expression of CD4 and CD8 in vervet lymphocytes

An important parameter in the study of T-lymphocyte responses in immunodeficiency diseases is the proportion of cells belonging to the two main subsets of lymphocytes, the inducer-helper (CD4<sup>+</sup>) and the cytotoxic-suppressor (CD8<sup>+</sup>) T-lymphocytes. In healthy human beings, the ratio between CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells is always >1, whereas in the nonhuman primate

species in this study, the ratio was varied. These ratios were <1 in four of them (vervet = 0.28, mandrills = 0.34, baboons 0.61 and cynomolgus monkeys = 0.90); the ratios were >1 in chimpanzees (1.13) and rhesus monkeys (1.20). The CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> ratio in normal human volunteers was 1.50 (Table 3). Furthermore, we show for the first time that the majority of mature vervet CD4 lymphocytes co-express CD4 and CD8 antigens (Fig. 2). Indeed, about 64% of CD4<sup>+</sup> vervet lymphocytes co-express CD8 antigen; nevertheless, only 16% of CD8<sup>+</sup> vervet lymphocytes co-express CD4 antigen. This CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> ratio was based on lymphocytes that are CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> since CD8 is also present in many NK cell subsets.

#### Discussion

This report details a comparative study in human beings and nonhuman primates (baboons, chimpanzees, mandrills, cynomolgus monkeys, rhesus monkeys and vervets) of some of the immunological parameters of importance in the study of the pathogenesis of immunodeficiency diseases induced by viral infections. The significance of NK cells in

Table 3. CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> ratio of PBMCs from human and nonhuman primates used

Species	n	CD4 <sup>+</sup> :CD8 <sup>+</sup> ratio
Baboons	11	0.61
Rhesus monkeys	11	1.20
Cynomolgus monkeys	11	0.90
Chimpanzees	10	1.13
Mandrills	11	0.34
Vervets	9	0.28
Humans	17	1.50

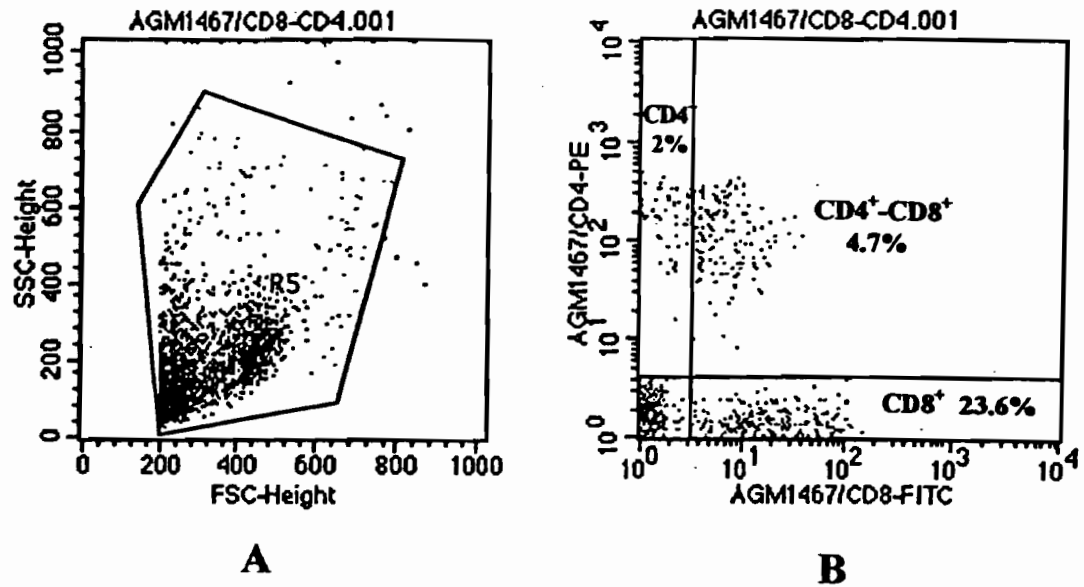


Fig. 2. Co-expression of CD4 and CD8 antigens in vervet lymphocytes. Panel A: Scatter plot showing typical forward light scatter (FSC) and right-angle light scatter (SSC) results with vervet peripheral whole blood. Panel B: Dot-plot for CD4 (FL2) vs CD8 (FL1) analysis of vervet lymphocytes.

the surveillance against infectious agents and in the control of neoplastic growth has been widely investigated, particularly in the mouse system [13]. In the present study, higher NK cell activity was observed in mandrills, cynomolgus monkeys and rhesus monkeys compared with chimpanzees, baboons and vervets. This observation is consistent with previous reports in which the cytotoxic capacity of rhesus monkey PBMCs was evaluated against human NK cell-sensitive and NK cell-resistant cell lines as targets [42, 46]. The NK activity in our cohort of healthy human volunteers was consistent with that of previous reports on NK cell lytic activity in human beings [6, 42]. Although significant differences were observed in the NK cell lytic activity among the species studied, there were no differences in the relative percentages of lymphocytes expressing the CD56 NK cell phenotype (Table 1). There was no positive correlation between the NK cell activity and the percentage of CD56<sup>+</sup> lymphocytes; PBMCs from the baboons studied had the highest mean percentage of lymphocytes expressing the CD56 phenotype, and yet displayed a relatively lower NK cell lytic activity compared with those of human and other primate PBMCs evaluated. The high NK cell lytic activity observed in the rhesus monkey PBMCs may be due in part to CD56<sup>+</sup> NK cells and in part to cells expressing a phenotype different from CD56 or to cells belonging to the T-lymphocyte lineage [42]. Furthermore, we have previously shown that NK activity could be decreased by lysis of effector cells with anti-CD56 in SIV<sub>cyn</sub>-infected

cynomolgus monkeys [29]. The NK cell activity shown by PBMCs was different for cynomolgus monkeys and rhesus monkeys compared with mandrills and vervets. Some vervets and mandrills caught in the wild are naturally infected with a SIV with nonapparent pathologic effects [24, 34, 35], whereas cynomolgus monkeys, rhesus monkeys and chimpanzees infected with a similar retrovirus displayed a symptomatology similar to that of human AIDS [12, 18, 21]. CD16 (FcγRIIIA), the low-affinity receptor for IgG, is expressed on the majority of peripheral blood NK cells. Ligation of CD16 with mAb or immune complexes activates NK cell cytotoxicity, cytokine secretion and stimulates the death of activated NK cells by apoptosis. NK cell activity has been found to be diminished in HIV-infected humans [4, 50] in both the late phases of disease [41]. The decrease of NK activity has been attributed in part to a functional defect [2, 50]. PBMCs of AIDS patients maintain the capacity to bind the target cell line K562, but are not able to lyse them, due to an impairment of microtubule rearrangement [50]. In early HIV infection, no decrease of absolute number or percentage of CD16<sup>+</sup> NK cells has been observed [41]. As disease progresses, the numbers of CD16<sup>+</sup> cells [54] or CD56<sup>+</sup> cells [36] decrease and this may also contribute to a decrease in NK activity. Similar to the observations in humans, SIV-infected rhesus macaques have been shown to have significantly lower NK activity than uninfected macaques [42]. A comparison of the NK cell activity in the SIV-seronegative vervets in our study

with the activity in this specie upon infection with SIV would be of interest, particularly regarding the phenotypic characteristics of subpopulation(s) of NK cells mediating the response, and T helper and T cytotoxic cells. In fact on completion of their intrathymic maturation, cells emigrate from the thymus and join the peripheral pool of T-lymphocytes. Several distinct peripheral T-lymphocyte populations are known to exist and can be identified because they express characteristic antigens on their membranes. Thus, helper T-cells in the human and several nonhuman subjects used in this study (baboons, chimpanzees, cynomolgus monkeys, rhesus monkeys and mandrills) express the leu2a determinant and suppressor cells express leu3a. Our study shows that the majority of mature vervet helper T-cells co-express at once leu2a and leu3a determinant. The ratios of CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> lymphocytes in all nonhuman primate studies were < 1, except in chimpanzees and rhesus monkeys, whereas that of normal human beings was 1.50. Thus, in the nonhuman primate studies, there appears to be a suppressed immunological status with regard to T-cell phenotypes, although no experimental evidence exists to support this notion. The greater number of CD8<sup>+</sup> cells in vervet is not reflected, however, in a truly suppressed immunological status, as indicated by the functional tests performed. Even though CD8<sup>+</sup> lymphocytes may exert a suppressive function, most of them are precursors of cytotoxic MHC-I-restricted T-cells CTLp or CTL effectors. Moreover, evidence has been provided in the HIV/SIV infection model for the existence of a non-MHC-I-restricted CD8-mediated antiviral activity that appears to be relevant to the containment of viral infection [23]. Furthermore, many previous studies reported that the increased proportion of CD8<sup>+</sup> cells in nonhuman primates may be related to either an immunosuppressive or immunoactive protective role, and so far, a mainly protective role has been attributed to the CD8<sup>+</sup> lymphocytes that may help explain the apparent resistance of some of the reported species to retroviral infections [19, 47].

In the mitogen-induced proliferation studies, PBMCs from mandrills had higher mean net counts per minute compared with those of chimpanzees, rhesus monkeys and cynomolgus monkeys; however, when the stimulation indices were compared, mandrill proliferative capacity was lower than those of these species.

Taken together, these observations on the normal immunological functions of nonhuman primates should be useful in the study of immune alterations induced by viral diseases in these animal models for human viral model diseases.

#### Acknowledgments

We thank the three anonymous reviewers whose comments greatly improved this paper.

#### References

1. BIRON CA: Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* 9:24-34, 1997.
2. BONAVIDA B, KATZ J, GOTTLIEB M: Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and in AIDS-related complex. *J Immunol* 137:1157-1163, 1986.
3. BOTTUIS E, BEN MOHAMED L, BRAHIMI K et al.: A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and CTL epitopes. *J Immunol* 156:2874-2884, 1996.
4. BRENNER BG, DASCAL A, MARGOLESE RG, WAINBERG MA: Natural killer cell function in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related diseases. *J Leukoc Biol* 46:75-83, 1989.
5. CAMBIAGGI A, ORENGO AM, MEAZZA R et al.: The natural killer-related receptor for HLA-C expressed, T cells from CD3<sup>+</sup> lymphoproliferative disease of granular lymphocytes displays either inhibitory or stimulatory function. *Blood* 87:2369-2375, 1996.
6. CARVER FM, THOMAS JM: Natural killer cells in rhesus monkeys: properties of effector cells which lyse Raji targets. *Cell Immunol* 117:56-69, 1988.
7. CLAVEL F, GUETARD D, BRUN-VEZINET F et al.: Isolation of new human retrovirus from a west African patient with AIDS. *Science* 233:343-346, 1986.
8. DANIEL MD, LETVIN NL, KING NW et al.: Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* 228:1201-1204, 1985.
9. GARDNER MB: The importance of nonhuman primate research in the battle against AIDS: A historical perspective. *J Med Primatol* 22:86-91, 1993.
10. GEORGES-COURBOT MC, LU CY, MAKUWA M et al.: Natural infection of a household pet red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus. *J Virol* 72:600-608, 1998.
11. HAYNES BF, DOWELL BL, HENSLEY LL, GORE I, METZGAR RS: Human T cell antigen expression by primate T cells. *Science* 215:298-300, 1982.
12. HENRICKSON RV, MAUL DH, OSBORN KG et al.: Epidemic of acquired immunodeficiency in rhesus monkeys. *Lancet* 1:388-390, 1983.
13. HERBERMAN RB, ORTALDO JR: Natural killer cells: their role in defenses against disease. *Science* 214:24-30, 1981.
14. HUET T, CHEYNIER R, MEYERHANS A, ROELANTS G, WAIN-HOBSON S: Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345:356-359, 1990.
15. JOHNSON PR, FOMSGAARD A, ALLAN JS et al.: Simian immunodeficiency viruses from African green monkeys display unusual genetic diversity. *J Virol* 64:1086-1092, 1990.
16. KANKI PJ, KURTH R, BECKER W, DREESMAN G, MCLANE MF, ESSEX M: Antibodies to simian T-lymphotropic retrovirus type III in African green monkeys and recognition of STLV-III viral proteins by AIDS and related sera. *Lancet* 1:1330-1332, 1985.
17. KANNAGI M, YETZ JM, LETVIN NL: In vitro growth characteristics of simian T-lymphotropic virus type III. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7053-7057, 1985.



18. KING NW, HUNT ED, LETVIN NL: Histopathologic changes in macaques with an acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am J Pathol* 113:382-388, 1983.
19. KURODA MJ, SCHMITZ JE, CHARINI WA et al.: Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Immunol* 162:5127-5133, 1999.
20. LANIER LL, PHILIPPS JH: Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today* 17:86-91, 1996.
21. LETVIN NL, EATON KA, ALDRICH WR et al.: Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2718-2722, 1983.
22. LETVIN NL, KING NW, REINHERTZ EL, HUNT RD, LANE H, SCHLOSSMAN SF: T lymphocyte surface antigens in primates. *Eur J Immunol* 13:345-347, 1983.
23. LEVY JA, MACKEWICZ CE, BAKER E: Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* 17:217-223, 1996.
24. LOWENSTINE LJ, PEDERSEN NC, HIGGINS J et al.: Seroepidemiologic survey of captive Old World primates for antibodies to human and simian retroviruses, and isolation of a lentivirus from sooty mangabeys (*Cercocebus atys*). *Int Cancer* 38:563-574, 1986.
25. MANDELBOIM O, DAVIS DM, REYBURN HT et al.: Enhancement of class II-restricted T cell responses by costimulatory NK receptors for class I MHC proteins. *Science* 274:2097-2100, 1996.
26. MAVOUNGOU E, GEORGES-COURBOT MC, POATY-MAVOUNGOU V et al.: HIV and SIV envelope glycoproteins induce phospholipase A2 activation in human and macaque lymphocytes. *J AIDS Hum Retro* 16:1-9, 1997.
27. MAVOUNGOU E, POATY-MAVOUNGOU V: CD4/GP120mac251 interaction induces phospholipase A2 (PLA2) activation in cynomolgus monkey lymphocytes. *J Med Primatol* 27:193-201, 1998.
28. MAVOUNGOU E, TOURÉ FS, YABA P, DELICAT A, POATY-MAVOUNGOU V: Peptide immunization restimulates the memory CD4 T cell response but fails to induce cytotoxic T lymphocytes in cynomolgus monkeys. *J Med Primatol* 27:202-209, 1998.
29. MAVOUNGOU E, TOURÉ FS, YABA P, SALL A, DELICAT A, POATY-MAVOUNGOU V: Detection of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific T-cell-mediated cytotoxicity in the peripheral blood from infected cynomolgus monkeys. *J Med Primatol* 28:307-317, 1999.
30. MEINL E, T'HART BA, BONTROP RE et al.: Activation of myelin basic protein-specific human T cell clone by antigen-presenting cells from rhesus monkeys. *Int Immunol* 7:1489-1495, 1995.
31. MORETTA A, SIVORI S, VITALE M et al.: Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 182:875-884, 1995.
32. MURAJANA Y, FUKAO K, NOGUCHI A, TAKENAKE O: Epitope expression on primate lymphocyte surface antigens. *J Med Primatol* 15:215-226, 1986.
33. NAUME B, NONSTAD U, STEINKJER B, FUNDERED S, SMELAND E, ESPEVIK T: Immunomagnetic isolation of NK and LAK cells. *J Immunol Methods* 136:1-9, 1991.
34. NERRIENET E, AMOURETTI X, MÜLLER-TRUTWIN MC et al.: Phylogenetic analysis of SIV and STLV type I in mandrills (*Mandrillus sphinx*): indication that intracolony transmissions are predominantly the results of male-to-male aggressive contacts. *AIDS Res Hum Retrov* 9:785-796, 1998.
35. OHTA Y, MASUDA T, TSUJIMOTO H et al.: Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiology survey of the virus in various non-human primates. *Int J Cancer* 41:115-122, 1988.
36. OHKAWA S, WILSON LA, LAROSA G, JAVAHERIAN K, MARTIN LN, MURPHEY-CORB M: Immune responses induced by prototype vaccines for AIDS in rhesus monkeys. *AIDS Res Hum Retrov* 10:27-38, 1994.
37. ONSRUD M, QVIGSTAD E: Natural killer cell activity after gynecologic infections with chlamydia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 63:613-615, 1984.
38. OZWARA HS, OLOBO JO, URUNGU LW: Evaluation of immune associated cells in lesions of L. major infected vervet monkeys. *Afr J Health Sci* 2:349-353, 1995.
39. OZWARA H, NIPHUIS H, BUIJS L et al.: Flow cytometric analysis on reactivity of human T lymphocyte-specific and cytokine-receptor-specific antibodies with peripheral blood mononuclear cells of chimpanzee (*Pan troglodyte*), rhesus macaque (*Macaca mulatta*), and squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Med Primatol* 26:164-171, 1997.
40. PEETERS M, HONORE C, HUET T et al.: Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 3:625-630, 1989.
41. PLAEGER-MARSHALL S, SPINA CA, GIORDI JV et al.: Alterations in cytotoxic and phenotypic subsets of natural killer cells in AIDS. *J Clin Immunol* 7:16-23, 1987.
42. POWELL JD, MCCLURE HM, ANDERSON D, FULTZ PN, SELL KW, AHMED-ABSARI A: Phenotypic and functional differences in NK and LAK cells in the peripheral blood of sooty mangabeys and rhesus macaques. *Cell Immunol* 124:107-118, 1989.
43. PROSS HF, BAINES MG, RUBIN P, SHRAGGE P, PATTERSON MS: Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. The quantitation of natural killer cell activity. *J Clin Immunol* 1:51-63, 1981.
44. RENARD V, CAMBIAGGI A, VELY F et al.: Transduction of cytotoxicity signals in natural killer cells: A general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* 155:205-221, 1997.
45. ROOK AH, MASUR H, LANE HC et al.: Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest* 72:398-403, 1983.
46. SAVARY CA, LOZOVA E, GRAY KN, JARDINE JH: Natural killer cell-mediated anti-tumor reactivity of rhesus monkeys. *Nat Immun Cell Growth Regul* 4:328-339, 1985.
47. SCHMITZ JE, KURODA MJ, SANTRA S et al.: Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283:857-860, 1999.
48. SEE DM, KHEMKA P, SAHL L, BUI T, TILLES JG: The role of natural killer cells in viral infections. *Scand J Immunol* 46:217-224, 1997.
49. SHARP PM, ROBERTSON DL, GAO F, HANH BH: Origins and diversity of human immunodeficiency viruses. *AIDS (Suppl)* 8:S27-S42, 1994.
50. SIRIANNI MC, SODDUS S, MALLORNI W, AIANCIA G, AIUTI F: Mechanism of defective natural killer activity in patients with AIDS is associated with defective distribution of tubulin. *J Immunol* 140:2565-2568, 1988.

51. TSUJIMOTO H, COOPER RW, KODAMA T et al.: Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 62:4044-4050, 1988.
52. TSUJIMOTO H, HASEGAWA A, MAKI N et al.: Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill. *Nature* 341:539-541, 1989.
53. TRINCHIERI G: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47:187-376, 1989.
54. VUILLIER F, BIANCO NE, MONTAGNIER L, DIEGHEIRO G: Selective depletion of low density CD8 + /CD16 + lymphocytes during HIV-infection. *AIDS Res Hum Retrov* 4:121, 1989.
55. YAMADA YK, YABE M, TATSUMU M: Phenotypic characterization of cynomolgus monkey natural killer cells. *Cell Immunol* 122:524-533, 1989.

## 2. Caractérisation et phénotypage du SIVmnd

### Article 2:

#### **Wild Mandrillus sphinx are carriers of two types of lentiviruses.**

Souquière S, Bibollet-Ruche F, Robertson DL, Makuwa M, Apetrei C, **Onanga R**, Kornfeld C, Plantier JC, Gao F, Abernethy K, White LJT, Karesh W, Telfer PT, Wickings EJ, Maucière P, Marx PA, Barré-Sinoussi F, Hahn BH, Müller-Trutwin MC, Simon F:

2001. *J Virol.*, (15), 7086-7096

Nous avons découvert un nouveau virus du mandrill, SIVmnd-2. Les deux SIV distincts circulent dans les populations des mandrills sauvages. Ces deux SIVmnd sont différents en ce qui concerne:

- leur relation phylogénétique, les deux virus se groupant dans des lignées différentes dans la partie *gag-pol-vif*
- leurs structures génomiques. Le SIVmnd-1, GB1 contient cinq gènes de régulation (*vif-vpr-tat-rev-nef*), tandis que SIVmnd-2, GB2 contient en plus le gène *vpx*
- leurs propriétés antigéniques, qui font que le SIVmnd-1 GB1 est quantifiable par le test Ag p24 tandis que le SIVmnd-2 l'est par celui de la p27.

## Wild *Mandrillus sphinx* Are Carriers of Two Types of Lentivirus

SANDRINE SOUQUIÈRE,<sup>1</sup> FRÉDÉRIC BIBOLLET-RUCHE,<sup>2</sup> DAVID L. ROBERTSON,<sup>3</sup> MARIA MAKUWA,<sup>1</sup> CRISTIAN APETREI,<sup>1</sup> RICHARD ONANGA,<sup>1</sup> CHRISTOPHER KORNFELD,<sup>4</sup> JEAN-CHRISTOPHE PLANTIER,<sup>5</sup> FENG GAO,<sup>2</sup> KATHARINE ABERNETHY,<sup>1</sup> LEE J. T. WHITE,<sup>6</sup> WILLIAM KARESH,<sup>6</sup> PAUL TELFER,<sup>1</sup> E. JEAN WICKINGS,<sup>1</sup> PHILIPPE MAUCLÈRE,<sup>7</sup> PRESTON A. MARX,<sup>8,9</sup> FRANÇOISE BARRÉ-SINOUSI,<sup>4</sup> BEATRICE H. HAHN,<sup>2</sup> MICHAELA C. MÜLLER-TRUTWIN,<sup>4</sup> AND FRANÇOIS SIMON<sup>1,5\*</sup>

Laboratoire de Virologie, UGENET, SEGC, Réserve de la Lopé, Centre International de Recherches Médicales, Franceville, Gabon<sup>1</sup>; Department of Medicine and Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama<sup>2</sup>; Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom<sup>3</sup>; Unité de Biologie des Rétrovirus, Institut Pasteur, Paris,<sup>4</sup> and Laboratoire de Virologie, GRAM-IFR23, Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Charles Nicolle, Rouen,<sup>5</sup> France; Wildlife Conservation Society, Bronx,<sup>6</sup> and Aaron Diamond AIDS Research Center, The Rockefeller University, New York,<sup>9</sup> New York; Centre Pasteur, Yaoundé, Cameroon<sup>7</sup>; and Tulane University Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana<sup>8</sup>

Received 13 December 2000/Accepted 13 April 2001

*Mandrillus sphinx*, a large primate living in Cameroon and Gabon and belonging to the Papionini tribe, was reported to be infected by a simian immunodeficiency virus (SIV) (SIVmndGB1) as early as 1988. Here, we have identified a second, highly divergent SIVmnd (designated SIVmnd-2). Genomic organization differs between the two viral types; SIVmnd-2 has the additional *vpx* gene, like other SIVs naturally infecting the Papionini tribe (SIVsm and SIVrcm) and in contrast to the other SIVmnd type (here designated SIVmnd-1), which is more closely related to SIVs infecting *Protopithecus* (*Cercopithecus lhoesti lhoesti*) and sun-tailed (*Cercopithecus lhoesti solatus*) monkeys. Importantly, our epidemiological studies indicate a high prevalence of both types of SIVmnd; all 10 sexually mature wild-living monkeys and 3 out of 17 wild-born juveniles tested were infected. The geographic distribution of SIVmnd seems to be distinct for the two types: SIVmnd-1 viruses were exclusively identified in mandrills from central and southern Gabon, whereas SIVmnd-2 viruses were identified in monkeys from northern and western Gabon, as well as in Cameroon. SIVmnd-2 full-length sequence analysis, together with analysis of partial sequences from SIVmnd-1 and SIVmnd-2 from wild-born or wild-living mandrills, shows that the *gag* and *pol* regions of SIVmnd-2 are closest to those of SIVrcm, isolated from red-capped mangabeys (*Cercocebus torquatus*), while the *env* gene is closest to that of SIVmnd-1. *pol* and *env* sequence analyses of SIV from a related Papionini species, the drill (*Mandrillus leucophaeus*), shows a closer relationship of SIVdr1 to SIVmnd-2 than to SIVmnd-1. Epidemiological surveys of human immunodeficiency virus revealed a case in Cameroon of a human infected by a virus serologically related to SIVmnd, raising the possibility that mandrills represent a viral reservoir for humans similar to sooty mangabeys in Western Africa and chimpanzees in Central Africa.

Studies of the origin of human immunodeficiency viruses (HIV) indicate that these viruses have entered the human population as a result of zoonotic transmissions of simian immunodeficiency viruses (SIV) (16). To date, SIV infections have been detected in more than 20 species of African non-human primates. Complete sequences of these viruses are now available for 13. These fully characterized SIV can be classified into at least six approximately equidistant lineages. Five of these are represented by (i) SIVcpz from chimpanzees (*Pan troglodytes*), which groups with HIV type 1 (HIV-1) (7, 16, 35); (ii) SIVsm from sooty mangabeys (*Cercocebus atys*), which groups with HIV-2 (5, 22, 27); (iii) SIVagm from the four African green monkey species (genus *Chlorocebus*) (1, 11, 21, 30); (iv) SIVsyk from Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis albogularis*) (9, 20); and (v) SIVlhoest from L'hoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti lhoesti*) (2, 19), which groups with SIVsun from sun-tailed monkeys (*Cercopithecus lhoesti solatus*) (3). Note that prior to the identification of SIVlhoest, this fifth SIV

lineage was represented by SIVmnd from mandrills (*Mandrillus sphinx*) (38). The sixth lineage, represented by the SIV infecting colobus monkeys (*Colobus guereza*), has been described recently (8).

Based on their genome organization, primate lentiviruses form three groups. Viruses from the SIVagm, SIVsyk, SIVlhoest/SIVsun, and SIVcol lineages have a common structure comprising the *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *env*, and *nef* genes. Viruses from the SIVcpz/HIV-1 lineage have an additional gene, *vpu*, in the central part of the genome, whereas viruses from the SIVsm/HIV-2 lineage have a *vpx* gene in addition.

The divergence of SIV lineages often matches the divergence of their primate species host lineages, underscoring the ancient nature of these lentiviruses (1, 3, 18, 30). In addition to this apparent host-dependent evolution, different cross-species or cross-subspecies transmissions have occurred frequently between wild-living or captive primates (4, 7, 23, 39). African green monkeys have thus apparently transmitted their virus occasionally to patas monkeys and baboons (4, 23). And it has been suggested recently that the SIVmnd described in mandrills is the result of cross-species transmission to mandrills of a virus related to SIVlhoest (3, 19, 38).

The mandrill is a large semiterrestrial primate belonging to

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire Charles Nicolle, 1 rue de Germont, 76031 Rouen, France. Phone: 33 2 32 88 82 36. Fax: 33 2 32 88 83 10. E-mail: francois.simon@chu-rouen.fr.

the Papionini tribe, living in the tropical rain forests of Cameroon and Gabon (15). SIVmnd was first isolated from mandrills in Gabon in 1988, and from one isolate (SIVmndGB1) a molecular clone was derived (38) that was the only representative of SIVmnd until now. The genetic divergences observed between SIVmndGB1 and other SIV from the Papionini tribe preclude an evolutionary history of purely host-dependent evolution (17, 18). The study of the evolution of SIV is helpful for the understanding of the origin and evolution of HIV in humans. SIV from sooty mangabeys belonging to the Papionini genus have already given rise to a human virus (HIV-2) (5, 13; R. Marlink, Editorial, AIDS 10:689-699, 1996). To elucidate the infection of *M. sphinx* by a SIV closely related to that infecting the Cercopithecini tribe, we investigated the nature of the SIVmnd in wild-born captive mandrills and in wild-living mandrills from Cameroon and Gabon using new serological and virological tools. Similarly, seropositive samples identified in an epidemiological study performed on the human populations living in these countries were tested in order to search for the presence of HIV closely related to SIVmnd.

#### MATERIALS AND METHODS

**Simian samples.** Fifteen wild-born mandrills living in a large semi-free-ranging colony, established in 1983 at the International Center for Medical Research in Franceville, Gabon (CIRMF), were studied. The geographic origins of the mandrills are given in Table 1. Of the two viruses, SIVmndGB1 and SIVmndGB2, isolated from two founder animals in 1989, only SIVmndGB1 was completely sequenced, because SIVmndGB2 was considered very close (38). Viral transmission in the colony has occurred mostly via aggressive male-to-male conflicts (five males, designated M3, M9, M13, M14, and M15, were infected in the colony between 1985 and 1992) (31). A case of vertical transmission from a female, F17, to one of her offspring was suspected (31). The six SIVmnd-infected males and F17 died at the ages of 15 to 20 years of causes unrelated to immunodeficiency. Serum samples have been collected every year from all mandrills in the colony and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . All founder wild-born mandrills in the colony and their descendants were screened retrospectively for SIV using a new serological assay designed for specific SIV screening.

Thirteen wild-living mandrills (Lop 1 through Lop 13) were captured, sampled, and released in 1998 ( $n = 6$ ) and 1999 ( $n = 7$ ) during ecological studies in central Gabon.

Fourteen wild-born but captive mandrills and three drills captured in the wild when juvenile and since then housed in sanctuaries in Cameroon or Gabon were tested on the date of capture, using the same serological assay. A female mandrill (BK) housed in the San Diego Wild Animal Park since 1984 was also studied.

**Human sera.** A total of 19,762 human blood samples from Cameroon and Gabon were screened between 1994 and 1999. Of these, 6,515 and 15 were considered HIV-1 and HIV-2 positive, respectively (28; C. Tevi-Benissan, M. Okome, M. Makuwa, M. N. Nkoume, J. Lansoud-Soukate, A. Georges, M. C. Georges-Courbot, and L. Belec, Letter, Emerg. Infect. Dis. 4:130-131, 1998). These HIV-2 samples were further studied for their specific reactivities against SIV antigens.

**V3 peptide EIA screening.** All the simian and human samples were tested by a new peptide-based enzyme-linked immunoassay (EIA) detecting and differentiating antibodies against the V3 regions representative of the different SIV/HIV lineages (34). Peptides corresponding to V3 loops of HIV-1, HIV-2, SIVcpz, SIVsm, SIVagm, SIVrcm, and SIVmnd were synthesized. Wells of polyvinyl microtiter plates (Falcon) were coated with 100  $\mu\text{l}$  each of 2  $\mu\text{g}$  of antigen per ml diluted in 0.05 M bicarbonate buffer, pH 9.6, by incubation for 20 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . The wells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% Tween 20 (PBS-TW), and unoccupied sites were saturated with PBS containing 2% newborn calf serum (NBCS) by incubation for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , followed by washing in PBS-TW. Each serum sample was tested at a 1:100 dilution in 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.75 M NaCl, 10% NBCS, and 0.5% Tween 20 (PBS-TW-NBCS). The reactivity of each sample to all the peptides was tested. One hundred microliters of diluted serum was added to the wells and incubated for 30 min at room temperature. The wells were washed four times with PBS-TW, and peroxidase-conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> anti-human immunoglobulin (Sigma; 100  $\mu\text{l}$  of a 1:2,000 dilution in PBS-TW-NBCS) was added and

TABLE 1. Description of mandrills and drills included in this study

Animal and virus	Sex <sup>a</sup>	Age <sup>b</sup> (yr)	Origin <sup>c</sup>
<b>Mandrills with SIVmnd type 1</b>			
Mnd F17	F	2	?
Mnd 17B	F	<1	C
Mnd 17D	F	<1	C
Mnd 17G	M	<1	C
Mnd 17D1	M	<1	C
Mnd 17D2	F	<1	C
Mnd Lop 4	F	7	Lop
Mnd Lop 5	F	7	Lop
Mnd Lop 6	F	10	Lop
Mnd Lop 7	M	10	Lop
Mnd Lop 8	M	10	Lop
Mnd Lop 9	F	12	Lop
Mnd Lop 10	M	10	Lop
Mnd Lop 11	M	10	Lop
Mnd Lop 12	M	10	Lop
Mnd Lop 13	M	10	Lop
<b>Mandrills with SIVmnd type 2</b>			
Mnd M3	M	6	Mk
Mnd M7	M	2	Mk
Mnd M9	M	>14	FCV
Mnd M13	M	>12	Mk
Mnd M14	M	>8	Mk
Mnd M15	M	>8	?
Mnd PG13	F	3	PG
Mnd 302	F	3	CA
Mnd BK	F	18	Zoo
<b>Drills with SIVdrl</b>			
Drill 207	M	4	CA
Drill 006	F	<10	CA
Drill 007	M	<10	CA

<sup>a</sup> M, male; F, female.

<sup>b</sup> At date of seropositive identification.

<sup>c</sup> ?, place of birth in Gabon unknown; C, born in semifree colony in CIRMF; Lop, wild-living mandrills from Lopé reserve; Mk, Makokou; FCV, Franceville; PG, Port Gentil; CA, Cameroon (see Fig. 1); Zoo, San Diego, Calif.

incubated for 30 min at room temperature. The wells were washed four times with PBS-TW, and the reaction was revealed by incubation with hydrogen peroxide-*o*-phenyldiamine for 15 min at room temperature. Color development was stopped with 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the absorbance (expressed as the optical density [OD]) was read at 492 nm. The cutoff was established at 0.20.

**Virus isolation.** Frozen or fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from all infected adult mandrills but one (M3, for which no PBMC samples were available) were cocultured with human phytohemagglutinin (PHA)-stimulated PBMC as previously described (35). Cultures were performed separately in time to avoid cross-contamination. Viral replication was monitored by a reverse transcriptase (RT) assay (Lenti-RT Kit; Cavid Tech AB, Uppsala, Sweden) and by measurement of p27 antigen with the SIV-mono-clonal assay (SIV p27; Coulter, Hialeah, Fla.) and the HIV-1-polyclonal assay (Elavia p24; Sanofi-Pasteur, Paris, France).

**PCR and sequences.** In order to amplify all SIVmnd, degenerate primers (DR1 and Hpol4538 for the first round and Hpol4235 and Hpol4538 for the second round) were used to amplify a 303-bp fragment of *pol* from total cellular DNA or plasma (7, 10, 35). The 303-bp PCR products were directly sequenced. For the full-length genome of SIVmnd-2 M14, two specific primers (N-OR1, CCAAAGGACATGAAAAATAGGCATC, and N-OF1, AAGGTAGCCACA GTGTGTGGTGG) were generated to amplify the 5' and 3' parts of the genome by targeting unintegrated circular DNA from cultured cells (Expand high-fidelity *Taq* polymerase; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Nested PCRs were performed with another specific primer (N-OIR1, 5'-GGCCACTG TTTAATTCTKGGKCCATC-3') used with primer LPBS to amplify the 5' part. We used Hpol4235 with LPBS reverse to obtain the 3' part (10). The two fragments were cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, Wis.). Serial SIVmnd-2 primers were then synthesized to walk along the cloned fragments.

The primers used for amplification of Gp41 were designed by alignment of SIVmnd-1 GB1 and SIVmnd-2 M14 sequences. In the first round we amplified a 2.2-kb fragment by using EnvF1 (5'-ATAGGAAAACAARTGTGTRACAGT-3') and EnvR1 (5'-GTTTAGGCAGGGCTATCGACC-3'), and for the second round we used Gp41F (5'-CAGTGTGGTGGCACTGACTGTC-3') and Gp41R (5'-CAGTGTGGTGGCACTGACTGTC-3'). PCR products of 540 bp were sequenced directly.

**Sequence alignment.** Alignments were constructed for the partial *pol* gene (integrase region), the partial *env* gene (gp41 region), and the *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpx*, *tat*, *env*, and *nef* genes using CLUSTAL W (37). Alignments were adjusted manually where necessary. Exons that are entirely overlapped by other genes (the second *tat* exon and both *rev* exons) were not included in the analyses. Regions of ambiguous alignment and all gap-containing sites were excluded.

**SIVmnd type 2 diversity plot.** A concatenated amino acid alignment (proteome) was constructed that included the genes *gag*, *pol*, *vif*, and *env*. Note that the regions of *pol* that overlapped *gag* and *vif* were excluded from the concatenated alignment. The genetic distance between SIVmnd-2 M14 and representative SIV was calculated in 300-amino-acid windows that were incremented by 10 amino acids across the proteome alignment. For each pairwise comparison, amino acid sequence differences were plotted against the midpoint of each window.

**Phylogenetic analyses.** Phylogenetic trees inferred from amino acid sequence alignments were constructed by the neighbor-joining method (33), implemented using NEIGHBOR from the Phylogeny Inference Package (PHYLIP), version 3.5c, and distance matrices were generated with the JTT model of amino acid substitution (24), implemented using TREE-PUZZLE (36). Phylogenetic clusterings were assessed by performing 1,000 bootstrap replicates (implemented using SEQBOOT, NEIGHBOR, and CONSENSE from the PHYLIP package), with the JTT distance matrices generated using PUZZLEBOOT.sh (available from TREE-PUZZLE's website at <http://www.tree-puzzle.de>). Phylogenetic trees inferred from nucleotide sequence alignments were constructed by the neighbor-joining method with the HKY model of nucleotide substitution, implemented by using PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony), version 4. Phylogenetic clusterings were assessed by performing 1,000 bootstrap replicates using PAUP to implement neighbor joining with the HKY model of nucleotide substitution. Maximum likelihood analysis, using 10 sequences from each alignment, was also implemented, by using PROTML (with the JTT model of amino acid substitution) or NUCML (with the HKY model of nucleotide substitution) from the MOLPHY package, version 2.2, to perform an exhaustive search of all possible tree topologies and to identify the 100 best topologies with approximate likelihoods; the maximum-likelihood tree was then identified among these.

**Nucleotide sequence accession numbers.** All the SIVmnd sequences obtained in this study have been submitted to GenBank (accession numbers AF328276 to AF328295).

## RESULTS

**SIVmnd infects adult and juvenile mandrills in a semi-free-ranging colony.** The retrospective serological screening with the new SIV-specific EIA (34) confirmed that the two founder mandrills, M7 and F17, were already SIV positive upon their arrival at the CIRMF. EIA analysis also confirmed subsequent intracolony infection of five adult males (M3, M9, M13, M14, and M15). Five out of the 16 descendants of F17 (17B, 17D, 17D1, 17D2, and 17G) were revealed to be seropositive as well (Table 1). We thus confirmed the SIV infection in monkeys previously described as SIV infected (M7, F17, M3, M9, M13, M14, M15, and F17B) (31) and revealed four new cases of SIV seropositivity in recently born descendants of the female F17, suggesting a mother-to-child transmission in the colony (Fig. 1 and Table 1).

In order to isolate the virus from all animals, frozen or fresh PBMC from all seropositive mandrills except one (M3, for which PBMC samples were missing) were cocultured with human PHA-stimulated PBMC. Cultures were performed separately in time to avoid cross-contamination. Strong RT activity was detected in all culture supernatants after 7 to 14 days of culture. SIVmnd isolates from males were positive in both the anti-SIV p27 monoclonal and anti-HIV-1 p24 polyclonal assays, whereas the Gag antigen of the SIVmnd isolated from

F17 and her offspring was detected only by the HIV-1 polyclonal assay (data not shown). This discrepancy between polyclonal and monoclonal antibody detection suggested strong antigenic differences between the strains.

**Evidence for the cocirculation of a second SIVmnd strain within the colony.** In order to further examine the antigenic differences between the SIVmnd viruses derived from the founder animals M7 and F17, we tested the serum samples from the SIVmnd-infected animals with distinct commercial HIV-1/HIV-2 serological assays (Genscreen HIV1/2 [Bio-Rad-Sanofi] and HIV Determine [Abbott]). Interestingly, the sera from F17 and three of the five infected offspring remained negative in these tests, whereas the sera from the adult males were positive. To analyze whether these antigenic differences were associated with genetic differences between the M7- and F17-derived strains, we performed PCR amplification with DNA from uncultured PBMC from all seropositive mandrills. The PCRs were performed at different times for each strain, in addition to the usual precautions, in order to avoid contamination. By using primers specific for SIVmndGB1, we obtained positive results only for samples from F17 and her five seropositive descendants. In contrast, using these SIVmndGB1-related primers, we failed to amplify the DNA from the PBMC collected from the males. In order to exclude the possibility that the negative results for the adult males were due to a lower viral load, we amplified a region (*pol* integrase) of all SIVmnd in the colony by using degenerated *pol* primers for PCR. This *pol* region was sequenced for all viruses.

Phylogenetic analysis of these *pol* sequences showed a very close clustering of SIVmnd from F17 with that from her five descendants (17B, 17D, 17D1, 17D2, and 17G), confirming that they are epidemiologically linked infections (Fig. 2). The integrase fragment of SIVmndF17 was also very closely related to the sequence of the SIVmndGB1 clone. Pairwise sequence comparison indicated that SIVmndF17 shares high nucleotide identity with the SIVmndGB1 clone (99% identity), strongly suggesting that they are viruses from the same infected individual. Together with the SIVmndGB1 clone, SIVmndF17 sequences were more closely related to SIV from l'hoest monkeys than to other SIV. In contrast, SIVmnd from M7, M9, M13, M14, and M15 formed a group of highly related sequences that are more closely related to SIVdr1, a virus from the drill (*Mandrillus leucophaeus*) (6), than to SIVmndGB1 in this *pol* region (Fig. 2), confirming that the viruses from the males are epidemiologically related to each other (31) and indicating that the founder animal M7 was a carrier of a highly divergent SIV, distinct from SIVmndF17/GB1. These results show that two distinct SIVmnd are cocirculating in this colony, in contrast to what has been previously published (31, 38).

In order to exclude the possibility of contamination producing these results, uncultured frozen PBMC sampled from M7 early after his arrival in the colony and stored since then were directly amplified using the same strategy. Resequencing confirmed that this animal was infected in the wild by a strain serologically and genetically different from SIVmndGB1, the sequence of which was previously published. The female F17, who was still alive, was resampled, her proviral and plasma viruses were directly sequenced, and these sequences confirmed that her virus corresponds to SIVmndGB1. These data

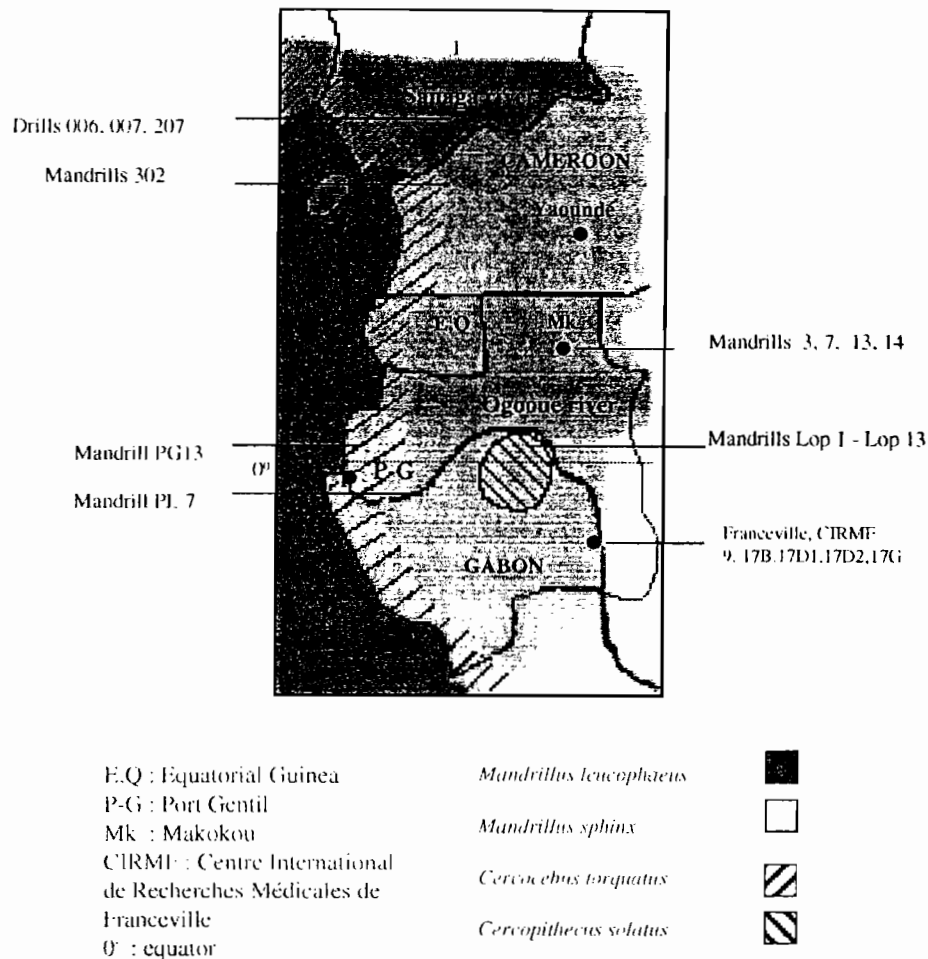


FIG. 1. Geographic origins of the seropositive samples and range of *M. sphinx*, *M. leucophaeus*, *C. solatus*, and *C. torquatus*.

correlate with the antigenic and serological discrepancies observed between SIVmndM7 and SIVmndF17.

**Identification of a second SIVmnd type.** We decided to analyze the full-length genome sequence from the divergent SIVmnd circulating in the males. Due to the limited volume of the original M7 samples, we sequenced the proviral genome from another male (M14) infected by M7 in 1988 (31). In contrast to SIVmndGB1, the genome organization of SIVmndM14 was similar to that of SIVsm and HIV-2, with the presence of an additional accessory gene, *vpx*.

SIVmndM14 also has an unusual long terminal repeat (LTR) structure, as the potential *trans*-activation response element (TAR) structure is different from that of the other SIV. Three stem-loop elements can be predicted. The first stem-loop is most similar to that found in SIVrcm, with a 2-base UU bulge, but is distinguished by the presence of a 7-base loop (CUGGGUU). The other two TAR elements found in SIVmndM14 were more similar to the first stem-loop structure found in SIVmndGB1, both presenting the characteristic 4-base bulge. The loop sequences were indistinguishable from the consensus CUGGGX. Two Sp1 and two NF- $\kappa$ B binding sites were predicted upstream of the TATA box.

Whatever the causes of the previous misidentification of SIVmnd, due to the distinct genome organizations and phylogenetic relationships we have identified, and for reasons of clarity, we propose to classify the SIVmndGB1-related viruses as SIVmnd type 1 (SIVmnd-1) and the SIVmndM14-related viruses as type 2 (SIVmnd-2).

**SIVmnd-2 is a complex recombinant.** Genetic identities between the SIVmnd-2 representative SIVmnd-2 M14 and other representative SIV were determined (Table 2). Across *gag*, *pol*, *vif*, *vpx*, and *tat*, SIVmnd-2 M14 is more closely related to SIVrcm. In *vpr* SIVmnd-2 M14 is just as closely related to SIVsmH4 as to SIVrcm. Across *env* and *nef*, SIVmnd-2 M14 is more closely related to SIVmndGB1, the SIVmnd-1 representative. The *env* V3 loop sequences in SIVmnd-1 (NRSVVSTPSATGLLFYHGLEPGKNLKKG) and SIVmnd-2 (NRSIVS VPSASGLIFYHGLEPGRNLKKG) are highly conserved relative to each other, explaining why our V3-based peptide EIA strategy succeeded in detecting these different viruses in the CIRMF colony, regardless of the infecting type.

The distinct relationships of SIVmnd-2 M14 with other SIV according to the genomic region analyzed were further investigated by constructing a proteome including the genes *gag*,

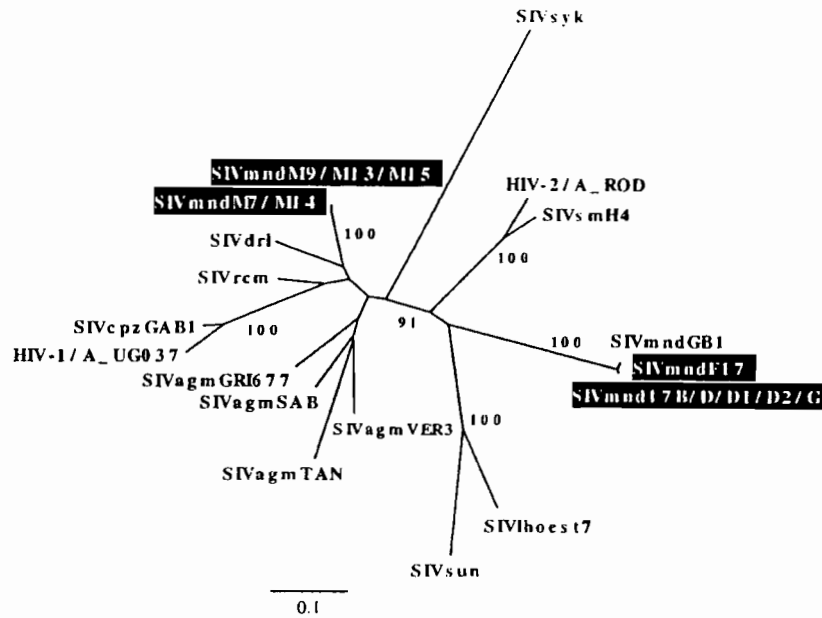


FIG. 2. Phylogenetic relationships in a *pol* region of newly derived SIVmnd sequences from adult and juvenile mandrills living in a semi-free-ranging colony at CIRMF in Gabon to other primate lentiviruses. This unrooted neighbor-joining tree (see Materials and Methods for further details) was inferred from amino acid comparisons from the *pol* integrase region; 138 amino acid sites were included. SIVmndGB1 corresponds to the sequence of the molecular clone (38). The numbers correspond to bootstrap support for phylogenetic clusterings. Bootstrap values lower than 75% are not shown. Branch lengths are drawn to scale, with the scale bar indicating amino acid replacements per site.

*pol*, *vif*, and *env* and performing diversity plotting comparing SIVmnd-2 M14 with representative SIV (Fig. 3). Across *gag*, *pol*, and *vif*, SIVmnd-2 M14 is more closely related to SIVrcm, while across *env*, SIVmnd-2 M14 is closest to SIVmnd-1 GB1. Such a switch in pairwise genetic distances between sequences is indicative of a recombinant ancestry of SIVmnd-2 M14.

We further tested the hypothesis that SIVmnd-2 M14 is a recombinant strain by phylogenetic analysis. Phylogenetic trees constructed for each gene region confirmed the relationship of SIVmnd-2 M14 with SIVrcm in *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, and *vpx* and with SIVmnd-1 GB1 in *env* and *nef*. The discordant phylogenetic position of SIVmnd-2 M14 according to genomic region is shown in Fig. 4 and was inferred from the *gag-pol-vif-env* concatenated alignment. Note that both SIVrcm and SIVmnd-2 M14 show similarity with SIVcpz and HIV-1 in at least part of *pol*, while in *env* and *nef*, SIVmnd-2 M14 clusters with SIVmndGB1, close to SIVhoest. The phylogenetic clustering of SIVmnd-2 M14 with either SIVrcm or SIVmndGB1 was highly significant (as assessed by bootstrap values), and the same discordant relationships were confirmed in tree topologies chosen using maximum likelihood.

**Both SIVmnd types are present in the wild.** If the recombination between SIVmnd-1 and SIVmnd-2 had happened in the colony, we should have detected a dually infected animal. Since this was not the case, we suspected that the SIVmnd-2 recombinant form was circulating in the wild and was introduced into the colony by the founder animal M7. We therefore screened wild animals for SIVmnd-2 and addressed in parallel the question whether SIVmnd-1 is equally distributed in the wild or rather resembles a "dead-end" infection. Thirteen free-living mandrills in a large colony of 700 individuals in the Lopé reserve (central Gabon [Fig. 1]), were tested first: all 10 adults

(6 males and 4 females) were strongly reactive against SIVmnd V3 in the EIA, while the three juvenile mandrills were negative (Table 1). PCR amplification of short fragments of *pol* (integrase) or *env* (gp41) was successful in 4 out of 10 seropositive samples (Lop 4, 6, 7, and 12); cellular control DNA was unamplifiable in the others, suggesting a low quality of the DNA collected under field conditions. We first sequenced a region in *pol* because it allows discrimination between SIVmnd-1 and SIVmnd-2. We sequenced this region for SIVmndLop4 and SIVmndLop6. Phylogenetic analysis shows that these adult wild *M. sphinx* individuals were infected by viruses that cluster with SIVmnd-1 (Fig. 5A and B). Amino acid comparisons of SIVmndLop4 to SIVmndLop6 show that these strains have 95.6% identity with each other, SIVmndLop4 identities with SIVmnd-1 GB1 and SIVmnd-2 M7 being 96 and 63%, respec-

TABLE 2. Amino acid sequence identities from pairwise comparisons of SIVmnd-2 M14 with other SIV representative of primate lentiviruses

SIV	% Amino acid sequence identity of SIVmnd-2 M14 with the indicated SIV							
	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>vif</i>	<i>vpx</i>	<i>vpr</i>	<i>lat</i>	<i>env</i>	<i>nef</i>
SIVmndGB1	57.3	62.6	40.0		44.6	47.6	61.1	63.1
SIVhoest7	56.4	61.8	36.9		44.6	42.9	50.7	53.4
SIVsun	54.3	60.8	37.7		44.6	50	51.9	61.2
SIVrcm	72.8	79.8	56.9	64.3	65.1	66.7	37.1	52.4
SIVsmH4	69.9	63.2	47.7	43.9	65.1	52.4	42.3	49.5
SIVagmVER3 <sup>a</sup>	66.4	66.3	46.1	40.8	39.8	57.1	39.7	51.5
SIVcpzGAB1	59.4	71.0	45.4		53.0	52.4	36.4	45.6
SIVsyk	62.4	57.7	46.9		22.9	59.5	36.4	41.7

<sup>a</sup> Included in both the *vpr* and *vpx* comparisons.



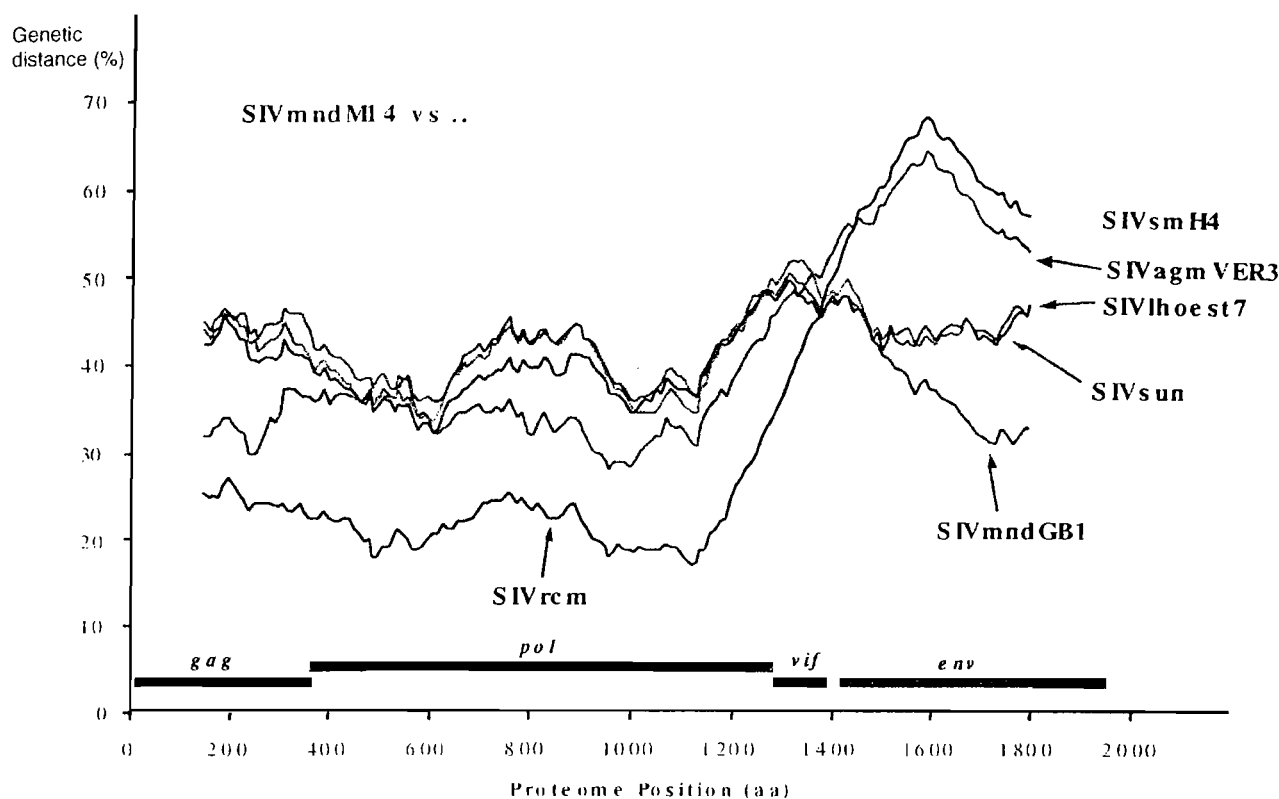


FIG. 3. Diversity plot comparing SIVmndM14 (the SIVmnd-2 representative) to SIVmndGB1 (the SIVmnd-1 representative), SIVrcm, SIVsun, SIVhoest, SIVsm, and SIVagm. For each pairwise comparison, protein sequence difference was plotted against the midpoint of a 300-amino-acid window that was incremented by 10 amino acids across a proteome alignment including the genes *gag*, *pol*, *vif*, and *env*. The positions of these genes are shown beneath the plot.

tively. The sequence divergences between SIVmndLop4 and SIVmndLop6 were significantly higher than that among SIVmnd-1 viruses from the semi-free-ranging colony at CIRMF, suggesting that they are not directly epidemiologically linked, but rather that they correspond to distinct viral representatives of SIVmnd-1. For SIVmndLop7 and SIVmndLop12, we successfully sequenced a short fragment (339 nucleotides) of gp41 *env*. The length of the sequence did not allow us to perform a phylogenetic analysis, but we observed 95 and 70% amino acid identity with SIVmnd-1 GB1 and SIVmnd-2 M14, respectively. No SIVmnd-2-infected mandrills were found in this group. Thus, the first assessment of SIVmnd prevalence in wild-living monkeys indicates that SIVmnd-1 circulates in wild mandrills of central Gabon. In addition, the infection prevalence seems high in sexually mature mandrills, irrespective of sex, and raises the possibility of sexual transmission of SIVmnd-1 in the wild.

We then screened mandrills originating from other geographic regions. The animals studied correspond to 14 mandrills that were captured at a young age in southwestern Cameroon and northern or western Gabon and were subsequently kept as pets or housed in rescue centers (Fig. 1; Table 1). These animals had been removed from the wild before the onset of sexual maturity and had had no further contact with infected animals. Three out of the 14 juvenile mandrills, one from Cameroon (female 302) and two from western Gabon (female

PG13 and male PL7), were V3 EIA positive. Plasma amplification succeeded in two cases (animals 302 and PG13). Sequencing of the integrase confirmed that these two *M. sphinx* individuals were infected by SIVmnd (Fig. 5A and C). Both SIVmndPG13 and SIVmnd302 clustered together with SIVmnd-2 in this region. In order to study whether they have a mosaic genome similar to SIVmnd-2 M14, we analyzed the gp41 *env* sequence from SIVmnd302. This SIVmnd from Cameroon is closely related to the SIVmnd-2 found in Gabon, indicating that it is also a recombinant (Fig. 6). In addition it provides evidence for a widespread distribution of SIVmnd-2.

Like type 1, SIVmnd-2 was found in both sexes. As the age range of the SIVmnd-2-infected mandrills resembles that of mandrills infected vertically by SIVmnd-1 in the CIRMF colony, mother-to-child transmission in the wild cannot be excluded.

We identified another case of SIVmnd-2 infection in the United States (Table 1). A female mandrill (BK) born in Sarasota, Fla., in 1971 and housed in the San Diego Wild Animal Park since 1984 was found to be seropositive in 1989, and the virus was isolated. Sequence comparison in *gag*, *pol* (Fig. 5A and C), and *env* indicated 90% identity with the SIVmnd-2 from mandrill M14. BK died at the age of 18 years from persistent diarrhea and weight loss, invasive *Balantidium coli* infection unresponsive to standard therapies, and disseminated atypical mycobacteriosis. However, despite the fact that such

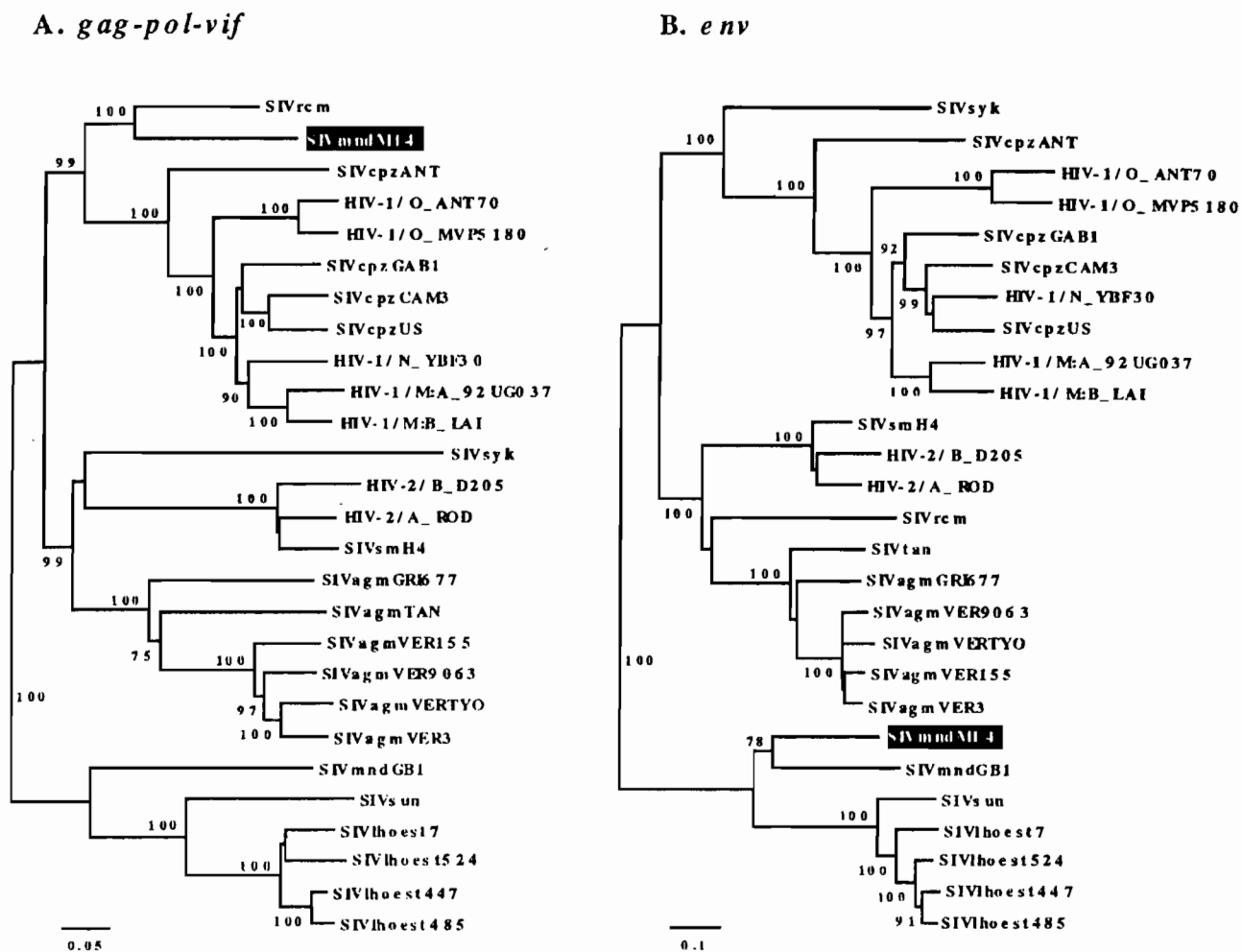


FIG. 4. Discordant phylogenetic relationships of SIVmnd-2 M14 (highlighted) in the *gag-pol-vif* (A) and *env* (B) regions. Rooted phylogenetic trees inferred by neighbor joining (see Materials and Methods for details) show the relationships of SIVmnd M14, the SIVmnd-2 representative, to other primate lentiviruses. The *gag-pol-vif* (A) and *env* (B) regions used to construct the trees correspond to positions 1 to 1403 and 1404 to 1959, respectively, in the proteome alignment (see Fig. 3). The numbers correspond to bootstrap support for the clusters to the right.

symptoms are indicative of immunodeficiency, one should note that 18 years represents the natural life span of a mandrill in captivity.

**SIVdrl are more related to SIVmnd-2 than to SIVmnd-1.** Mandrills are closely related to drills (*M. leucophaeus*) and allopatric with them (13). Drills have recently been reported to carry SIV (6). In order to study the relationship between SIVmnd and SIVdrl (Fig. 2), we characterized SIVdrl further. We identified three drills (Drl 006, Drl 007, and Drl 207) whose sera reacted positively with the V3 SIVmnd peptide in an EIA. All three were wild born in Cameroon. Drl 207, a sexually immature 4-year-old monkey, was already positive at the date of its rescue, confirming that this SIVdrl strain represents a natural infection. We sequenced a *pol* region from all three SIVdrl (Fig. 5A and C). They are the most closely related to the formerly described SIVdrl (6), which in turn is much more closely related to SIVmnd-2 than to SIVmnd-1. A 339-bp sequence in gp41 of SIVdrl007 indicates that it has the same recombinant structure as SIVmnd-2 (Fig. 6). *M. sphinx* and *M. leucophaeus* are the two species of the *Mandrillus* genus, and

the phylogenetic relationships between SIVdrl and SIVmnd-2 suggest that these related viruses might have codiverged in their respective host species.

**A human virus serologically related to V3 of SIVmnd.** Our results show that SIVmnd-2 is related to SIV from the Papionini tribe. Indeed, it has the same genomic organization as SIVsm, and it is phylogenetically related to SIVrcm and SIVdrl. Viruses from the Papionini, such as SIVsm, seem to be transmissible to humans. We addressed the question whether humans could be at risk for SIVmnd-2 by looking for SIVmnd-related viruses in humans. We screened samples collected during a large survey of HIV diversity in Cameroon and Gabon performed between 1994 and 1999 (28; Tevi-Benissan et al., letter, 1998). Among the 6,515 HIV-positive sera, 15 were positive by HIV-2 Western blotting (WB). By our HIV and SIV V3-specific EIA, 14 out of the 15 sera reacted specifically with the SIVsm/HIV-2 V3 loop. The remaining subject (patient 97-6178) was a 65-year-old symptom-free man attending a clinic in South Cameroon. His HIV-2 WB was positive for transmembrane and core antigens but not for *pol* products.

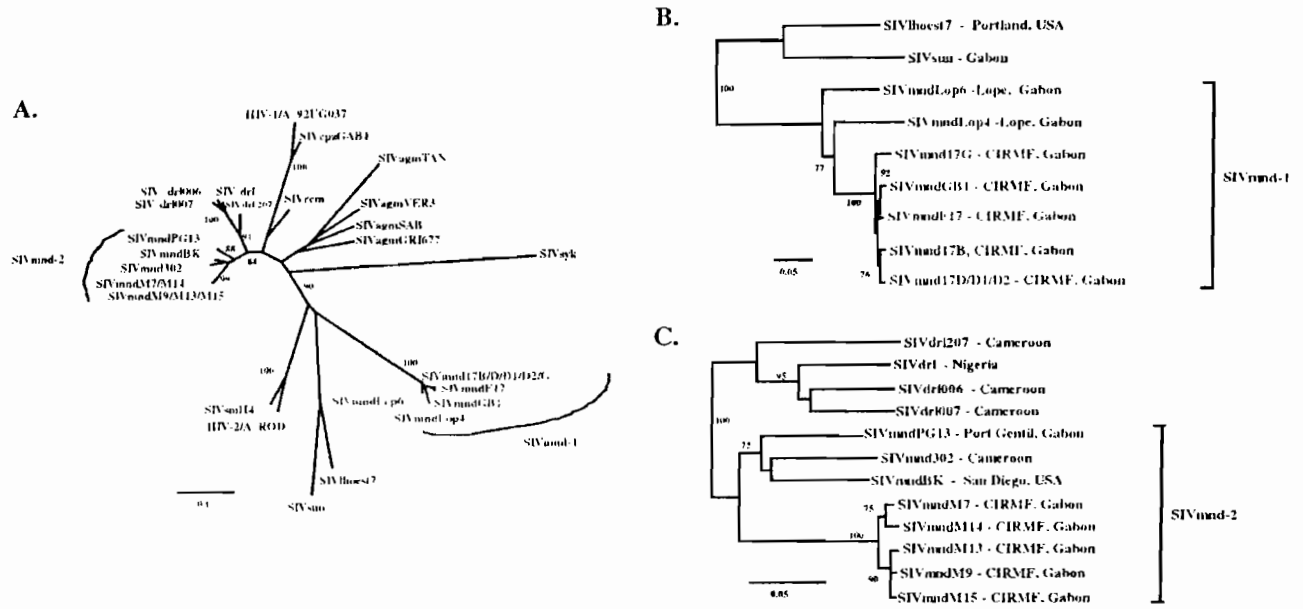


FIG. 5. Phylogenetic relationships in a *pol* region of SIVmnd and SIVdr1 strains isolated from adult and juvenile mandrills and drills of distinct geographic origins (Table 1). (A) Unrooted phylogenetic tree showing both the SIVmnd-1 and SIVmnd-2 clades; (B and C) rooted phylogenetic trees showing the SIVmnd-1 clade and the SIVmnd-2 clade, respectively. The three phylogenetic trees were inferred by neighbor joining. The unrooted phylogeny was inferred from amino acid sequence comparisons (138 amino acid sites) of *pol* integrase. The two rooted phylogenies were inferred from nucleotide sequence comparisons (414 nucleotide sites) from the same *pol* region.

Conversely, his HIV-1 WB was positive only for *pol* products. On a commercial dot test using separate HIV-1 recombinant protein and HIV-2 transmembrane peptide as antigens (Multispot; Bio-Rad-Pasteur), the serum reacted only against the HIV-1 recombinant spot. These unusual serological profiles prompted us to further characterize this sample. We observed a high reactivity directed solely and strongly against the SIVmnd V3 loop (Table 3). We then compared these results to those obtained for 164 HIV-2-infected patients (150 living in France and 14 from Cameroon and Gabon) and to those of our SIVmnd-infected mandrills. Table 3 summarizes the specificity of our V3 loop peptide assay. The HIV-2 samples reacted strongly against the HIV-2/SIVsm V3 loop and displayed a low cross-reactivity against the SIVagm V3 loop. None of these HIV-2 samples reacted against the SIVmnd loop. All the sam-

ples from seropositive mandrills reacted only against their specific peptide, with no cross-reactivity against the heterologous V3 peptides (Table 3).

All molecular investigations of this atypical human serum sample, stored under local conditions before shipping to our

TABLE 3. Reactivity of a human sample against SIVmnd V3 loop peptide<sup>a</sup>

Sample source	No. of samples	OD ± SD for:		
		V3 SIVagm <sup>b</sup>	V3 SIVsm/HIV-2 <sup>c</sup>	V3 SIVmnd <sup>d</sup>
HIV-2 infected patients	164	0.12 ± 0.2	0.98 ± 0.46	0.03 ± 0.02
SIVmnd-infected mandrills and drills	28	0.06 ± 0.05	0.09 ± 0.08	1.8 ± 0.53
Patient 97-6178	1	0.01	0.02	1.7

<sup>a</sup> Determined by a V3 loop peptide-based EIA (34). The reactivity of the sample (from patient 97-6178) was compared with those for HIV-2-positive samples and SIVmnd-positive samples.

<sup>b</sup> Peptide corresponding to the V3 loop from SIV of African green monkeys (*C. sabaeus*).

<sup>c</sup> Peptide corresponding to the V3 loop consensus sequence from SIV of sooty mangabeys and the HIV-2 Rod prototype strain.

<sup>d</sup> Peptide mimicking the V3 loop of SIVmnd-1 GB1.

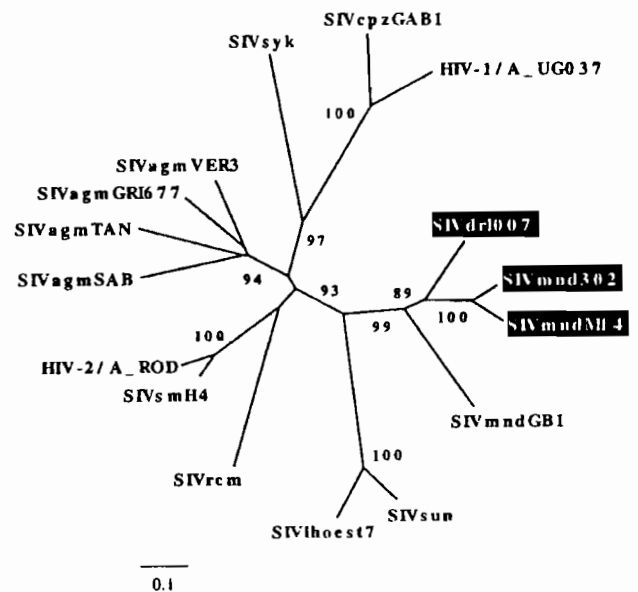


FIG. 6. Phylogenetic relationships of SIVmnd-2 M14, SIVmnd302, and SIVdr1007 isolated from mandrills and drills from Cameroon and Gabon to other primate lentiviruses in an *env* region. This unrooted tree is inferred from amino acid comparisons (146 amino acid sites remained after gap stripping) from *env* (gp41 region).

laboratory, were unsuccessful. An attempt to isolate the strain was also negative. A poorly replicating virus could explain these failures. The patient has since been lost to follow-up, precluding firm diagnosis. However, given the high V3 loop sequence divergence between SIV and HIV, the accuracy and the high specificity of our peptide EIA, and the strong and specific reactivity of this human sample against the SIVmnd V3 region, this result can only be explained by infection with a virus that is SIVmnd-like, at least in this region of Env.

## DISCUSSION

**SIVmnd classification.** Our results show that two distinct SIV types infect wild-living mandrills. These two SIVmnd are different with respect to (i) their phylogenetic relationships, clustering in different SIV lineages in phylogenies inferred from different genomic regions; (ii) genome structures, as SIVmnd-1 (represented by GB1) lacks the *vpx* gene whereas the second virus, SIVmnd-2 (represented by M14), includes it; and (iii) antigenic properties, as shown by a commercial EIA and a p24 antigen assay. These data are analogous to the situation encountered in humans. The human population is infected by two different lentiviral types, HIV-1 and HIV-2, which have different origins, different genome structures, and different antigenic properties (Marlink, editorial, 1996). These features, together with epidemiological evidence for the circulation of these two mandrill viruses in the wild, call for a classification system for SIVmnd. We propose, by analogy with HIV classification, that these viruses be considered different "types" of SIVmnd. We suggest that the original lineage of SIVmnd, which includes SIVmndGB1, be named SIVmnd type 1 (SIVmnd-1) and that the second lineage, identified here, be classified as SIVmnd type 2 (SIVmnd-2).

**SIVmnd, an SIV diversity paradigm: host-dependent evolution versus cross-species transmission.** The two types of SIVmnd naturally infecting *M. sphinx* can be considered a model for the complexity of HIV/SIV evolution. Both SIVmnd types circulate in the wild, but they might have a distinct geographic distribution. All SIVmnd-2-infected mandrills originated from Cameroon (the region south of the Sanaga River) and the neighboring region of north Gabon (north of the Ogooué River), (Fig. 1). Conversely, the SIVmnd-1-infected mandrills were found south of the Ogooué River. Studies of mitochondrial DNA from infected mandrills will determine if a differential haplotype distribution coincides with the SIVmnd type distribution.

SIVmnd-1 most likely originates from an ancient cross-species transmission from a *Cercopithecinae* ancestor (2, 3, 19). Our data demonstrate that this cross-transmission between two different genera is not a dead-end, as this virus is apparently spreading among wild mandrills. According to our data, however, SIVmnd-2 might have a more host-specific history than SIVmnd-1. SIVmnd-2 shares a high degree of homology in the 5' end of the genome with SIVdrl and SIVrcm, which have been isolated from other species belonging to the Papionini tribe, favoring a common SIV ancestor for these strains. The ancestor of the current SIVmnd-2 is probably a recombinant, as SIVmnd-2 is related to SIVrcm in *gag* and *pol*, and SIVrcm itself is a recombinant form, sharing homology in *pol* with SIVcpz and a relationship with SIVsm

in *gag* (7, 14). Interestingly, *C. torquatus* is the closest relative of the *Mandrillus* genus (17). Our data indicate that the prevalence of both types seems sufficiently high in nature to allow dual infection. An overlapping geographic range in the past between mandrills infected by the different types would explain how recombination could occur between the SIVmnd-2 parental virus and SIVmnd-1, but although possible, this remains to be demonstrated.

These apparently successful recombination events between strains infecting different genera illustrate the potential of lentiviral diversification. Recent evidence suggests not only that recombination between distinct lentiviruses is possible but also that this phenomenon is responsible for the emergence of viruses which have succeeded in dominating the epidemics in both human and nonhuman primates. HIV-1 group M recombinant forms are successfully spreading in the world (12, 25, 29, 32). Also, at least two nonhuman primate species are infected with recombinant forms of lentiviruses: *Cercopithecus aethiops sabaeus* (23) and red-capped mangabeys (14). Taken together, the characterization of two SIVmnd types epitomizes our knowledge of SIV diversity, including codivergence of SIV and host species, SIV cross-species transmission between primates, and, finally, recombination. These data further demonstrate that recombinant viral forms have a great capacity to contribute to epidemics and might explain why the circulation of the parental, nonrecombinant SIVmnd-2 ancestor, which might be rare or is now extinct, went undetected in epidemiological studies.

**Zoonotic transmission of SIVmnd?** A case of retrovirus transmission from mandrills to humans has already been documented. Simian T-cell lymphotropic virus type 1 (STLV-1) from *M. sphinx* has been described as the simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtype D (26). Indeed, a close molecular and phylogenetic relationship has been reported between STLV-1 subtype D from mandrills in Gabon and HTLV-1 strains obtained from pygmies living in Cameroon and the Central African Republic and from a healthy nonpygmy carrier in Gabon.

The atypical serological reactivities observed with commercial assays for a serum from an HIV-infected human in Cameroon already indicated that the patient could be infected by a virus which is different from known HIV-1 or HIV-2. Our peptide-based serological test, which displays a high discriminatory capacity between HIV and SIV from different lineages (34), revealed a human case of lentiviral infection serologically reactive to the SIVmnd V3 peptide. The high rate of SIV seropositivity in wild mandrills favors the probability of exposure of the population to infected blood during hunting or food preparation, as the wild troops of mandrills in Cameroon and Gabon are heavily hunted. Moreover, juvenile mandrills are often kept as pets. As SIVsm was able to jump to the human population, the possibility that SIVmnd-infected mandrills could also represent a reservoir posing a risk for humans cannot be excluded. This single case of human infection by a strain serologically related to SIVmnd V3 may represent a dead-end infection, similar to those observed for subtypes D and E of HIV-2 infection (13). However, this needs confirmation by sequence identification. This case, nonetheless, does illustrate the potential for currently unrecognized zoonotic reservoirs of AIDS viruses for humans.

In conclusion, we have identified a second SIV type naturally infecting *M. sphinx*. Mandrills, naturally infected by two distinct SIV lineages, could be a useful model for coinfection studies. The observation of SIV<sub>md</sub> mother-to-child transmission opens up research opportunities for better understanding of one major public health problem of HIV/AIDS. Finally, our epidemiological study of humans illustrates that the HIV pandemic still calls for large-scale and longitudinal worldwide epidemiological surveys.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French National Agency on AIDS Research (ANRS), grant 2000/038, and grants NO1 AI 85338 (to B.H.H.) and RO1 AI 44596 (to P.M. and B.H.H.) from the National Institutes of Health. D.L.R. is supported by a Wellcome Trust Biodiversity Fellowship, and C.K. is supported by the Daimler-Benz Foundation.

We thank John Clewley for permission to use an unpublished SIV<sub>drl</sub> sequence. Blood sampling from mandrills was performed by Pierre Rouquet (CIRMF), Jack Allen, Kent Osborn, April Gorow (SDZ/WAP, San Diego, Calif.), Stacey Hoffman, Myra Jennings, Nicholas W. Lerche (California Regional Primate Research Center, University of California, Davis), William Karesh, and John Lewis.

#### REFERENCES

- Allan, J. S., M. Short, M. E. Taylor, S. Su, V. M. Hirsch, P. R. Johnson, G. M. Shaw, and B. H. Hahn. 1991. Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *J. Virol.* 65:2816-2828.
- Beer, B. E., E. Bailes, G. Dapolito, B. J. Campbell, R. M. Goeken, M. K. Axthelm, P. D. Markham, J. Bernard, D. Zagury, G. Franchini, P. M. Sharp, and V. M. Hirsch. 2000. Patterns of genomic sequence diversity among their simian immunodeficiency viruses suggest that L'Hoeest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*) are a natural lentivirus reservoir. *J. Virol.* 74:3892-3898.
- Beer, B. E., E. Bailes, R. Goeken, G. Dapolito, C. Coulibaly, S. G. Norley, R. Kurth, J. P. Gautier, A. Gautier-Hion, D. Vallet, P. M. Sharp, and V. M. Hirsch. 1999. Simian immunodeficiency virus (SIV) from sun-tailed monkeys (*Cercopithecus solatus*): evidence for host-dependent evolution of SIV within the *C. lhoesti* superspecies. *J. Virol.* 73:7734-7744.
- Bibollet-Ruche, F., A. Galat-Luong, G. Cuny, P. Sarni-Manchado, G. Galat, J. P. Durand, X. Pourrut, and F. Veas. 1996. Simian immunodeficiency virus infection in a patas monkey (*Erythrocebus patas*): evidence for cross-species transmission from African green monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) in the wild. *J. Gen. Virol.* 77:773-781.
- Chen, Z., P. Telfer, A. Gettie, P. Reed, L. Zhang, D. D. Ho, and P. A. Marx. 1996. Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIV<sub>sm</sub>: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J. Virol.* 70:3617-3627.
- Clewley, J. P., J. C. Lewis, D. W. Brown, and E. L. Gadsby. 1998. A novel simian immunodeficiency virus (SIV<sub>drl</sub>) *pol* sequence from the drill monkey, *Mandrillus leucophaeus*. *J. Virol.* 72:10305-10309.
- Corbet, S., M. C. Müller-Trutwin, P. Vermisse, S. Delarue, A. Ayoub, J. Lewis, S. Brunak, P. Martin, F. Brun-Vezinet, F. Simon, F. Barre-Sinoussi, and P. Maucere. 2000. *env* sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J. Virol.* 74:529-534.
- Cournaud, V., X. Pourrut, F. Bibollet-Ruche, E. Mpoudi-Ngole, A. Bourgeois, E. Delaporte, and M. Peeters. 2001. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus from guereza colobus monkeys (*Colobus guereza*) in Cameroon: a new lineage in the nonhuman primate lentivirus family. *J. Virol.* 75:857-866.
- Emau, P., H. M. McClure, M. Isahakia, J. G. Else, and P. N. Fultz. 1991. Isolation from African Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 65:2135-2140.
- Fransen, K., P. Zhong, H. De Beenhouwer, G. Carpel, M. Peeters, J. Louwagie, W. Janssens, P. Piot, and G. van der Groen. 1994. Design and evaluation of new, highly sensitive and specific primers for polymerase chain reaction detection of HIV-1 infected primary lymphocytes. *Mol. Cell. Probes.* 8:317-322. (Erratum, 9:373, 1995.)
- Fukasawa, M., T. Miura, A. Hasegawa, S. Morikawa, H. Tsujimoto, K. Miki, T. Kitamura, and M. Hayami. 1988. Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group. *Nature* 333:457-461.
- Gao, F., D. L. Robertson, S. G. Morrison, H. Hui, S. Craig, J. Decker, P. N. Fultz, M. Girard, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and P. M. Sharp. 1996. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J. Virol.* 70:7013-7029.
- Gao, F., L. Yue, D. L. Robertson, S. C. Hill, H. Hui, R. J. Biggar, A. E. Neequaye, T. M. Whelan, D. D. Ho, G. M. Shaw, et al. 1994. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.* 68:7433-7447.
- Georges-Courbot, M. C., C. Y. Lu, M. Makuwa, P. Telfer, R. Onanga, G. Dubreuil, Z. Chen, S. M. Smith, A. Georges, F. Gao, B. H. Hahn, and P. A. Marx. 1998. Natural infection of a household pet red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 72:600-608.
- Grubb, P. 1973. Distribution, divergence and speciation of the drill and mandrill. *Fol. Primatol.* 20:161-177.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287:607-614.
- Harris, E. E., and T. R. Disotell. 1998. Nuclear gene trees and the phylogenetic relationships of the mangabeys (Primates: Papionini). *Mol. Biol. Evol.* 15:892-900.
- Hasegawa, M., H. Kishino, and T. Yano. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22:160-174.
- Hirsch, V. M., B. J. Campbell, E. Bailes, R. Goeken, C. Brown, W. R. Elkins, M. Axthelm, M. Murphey-Corb, and P. M. Sharp. 1999. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIV) from L'Hoeest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*): implications for the origins of SIV<sub>md</sub> and other primate lentiviruses. *J. Virol.* 73:1036-1045.
- Hirsch, V. M., G. A. Dapolito, S. Goldstein, H. McClure, P. Emau, P. N. Fultz, M. Isahakia, R. Lenroot, G. Myers, and P. R. Johnson. 1993. A distinct African lentivirus from Sykes' monkeys. *J. Virol.* 67:1517-1528.
- Hirsch, V. M., C. McGann, G. Dapolito, S. Goldstein, A. Ogen-Odoi, B. Biryawaho, T. Lakwo, and P. R. Johnson. 1993. Identification of a new subgroup of SIV<sub>gm</sub> in tanzanian monkeys. *Virology* 197:426-430.
- Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, and P. R. Johnson. 1989. An African primate lentivirus (SIV<sub>sm</sub>) closely related to HIV-2. *Nature* 339:389-392.
- Jin, J. M., H. Hui, D. L. Robertson, M. C. Müller, F. Barré-Sinoussi, V. M. Hirsch, J. F. Allan, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 1994. Mosaic genome structure of simian immunodeficiency viruses from West African green monkeys. *EMBO J.* 13:2935-2947.
- Jones, D. T., W. R. Taylor, and J. M. Thornton. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8:275-282.
- Liitsola, K., I. Tashkinova, T. Laukkanen, G. Korovina, T. Smolskaja, O. Momot, N. Mashkilevson, S. Chaplinskas, H. Brummer-Korvenkontio, J. Vanhatalo, P. Leinikki, and M. O. Salminen. 1998. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS* 12:1907-1919.
- Mahieux, R., C. Chappey, M. C. Georges-Courbot, G. Dubreuil, P. Maucere, A. Georges, and A. Gessain. 1998. Simian T-cell lymphotropic virus type 1 from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type 1 subtype D. *J. Virol.* 72:10316-10322.
- Marx, P. A., Y. Li, N. W. Lerche, S. Sutjipto, A. Gettie, J. A. Yee, B. H. Brotman, A. M. Prince, A. Hanson, R. G. Webster, et al. 1991. Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a West African pet sooty mangabey. *J. Virol.* 65:4480-4485.
- Maucere, P., I. Loussert-Ajaka, F. Diamond, P. Fagot, S. Souquere, M. Monny Lobe, F. X. Mbopi Keou, F. Barre-Sinoussi, S. Saragosti, F. Brun-Vezinet, and F. Simon. 1997. Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *AIDS* 11:445-453.
- McCutchan, F. E., J. K. Carr, M. Bajani, E. Sanders-Buell, T. O. Harry, T. C. Stoekli, K. E. Robbins, W. Gashau, A. Nasidi, W. Janssens, and M. L. Kalish. 1999. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology* 254:226-234.
- Müller, M. C., N. K. Saksena, E. Nerrienet, C. Chappey, V. M. Herve, J. P. Durand, P. Legal-Campodonico, M. C. Lang, J. P. Digoutte, A. J. Georges, P. Sonigo, and F. Barré-Sinoussi. 1993. Simian immunodeficiency viruses from central and western Africa: evidence for a new species-specific lentivirus in tanzanian monkeys. *J. Virol.* 67:1227-1235.
- Nerrienet, E., X. Amouretti, M. C. Müller-Trutwin, V. Poaty-Mavoungou, I. Bedjebaga, H. T. Nguyen, G. Dubreuil, S. Corbet, E. J. Wickings, F. Barre-Sinoussi, A. J. Georges, and M. C. Georges-Courbot. 1998. Phylogenetic analysis of SIV and STLV type 1 in mandrills (*Mandrillus sphinx*): indications that intracolony transmissions are predominantly the result of male-to-male aggressive contacts. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 14:785-796.
- Peeters, M., F. Liegeois, N. Torimiro, A. Bourgeois, E. Mpoudi, L. Vergne, E. Saman, E. Delaporte, and S. Saragosti. 1999. Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombi-

- nant isolated from a Cameroonian patient. *J. Virol.* 73:7368–7375.
33. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
  34. Simon, F., S. Souquière, F. Damond, A. Kfutwah, M. Makuwa, E. Leroy, P. Rouquet, J. L. Berthier, J. Rigoulet, A. Lecu, P. T. Telfer, I. Pandrea, J. C. Plantier, P. A. Marx, F. Barré-Sinoussi, M. C. Müller-Trutwin, and C. Apetrei. 2001. A synthetic peptide strategy for the detection of and discrimination between highly divergent primate lentiviruses. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 17:937–952.
  35. Simon, F., P. Mauclore, P. Roques, I. Loussert-Ajaka, M. C. Müller-Trutwin, S. Saragosti, M. C. Georges-Courbot, F. Barré-Sinoussi, and F. Brun-Vézinet. 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4:1032–1037.
  36. Strimmer, K., and A. von Haeseler. 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13:964–969.
  37. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W—improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
  38. Tsujimoto, H., A. Hasegawa, N. Maki, M. Fukasawa, T. Miura, S. Speidel, R. W. Cooper, E. N. Moriyama, T. Gojobori, and M. Hayami. 1989. Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill. *Nature* 341:539–541.
  39. van Rensburg, E. J., S. Engelbrecht, J. Mwenda, J. D. Laten, B. A. Robson, T. Stander, and G. K. Chege. 1998. Simian immunodeficiency viruses (SIVs) from eastern and southern Africa: detection of a SIVagm variant from a chacma baboon. *J. Gen. Virol.* 79:1809–1814.

### Article 3:

Simian immunodeficiency virus from mandrill (*Mandrillus sphinx*) SIVmnd experimentally infects human and non-human primate cells.

Poaty-Mavoungou V, **Onanga R**, Bedjabaga I and Mavoungou E:

2001. *Microbes and Infection*, (3), 1-12.

Dans cette étude, nous avons analysé les caractéristiques virologiques de l'infection SIVmnd *in vitro* sur les PBMC de 6 espèces de primates (mandrills, macaque cynomolgus, macaque rhésus, chimpanzé, vervet et babouin), ainsi que celle de l'homme, et de quatre lignées de cellules lymphocytaires (Supt1, CEMx174, Molt4 clone 8) et une lignée monocyttaire (U937). Nous avons infecté toutes ces cellules avec du surnageant de culture du SIVmnd titré à  $5,6 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml par la méthode en dilution limite, sur des cellules autologues de mandrills.

La production de particules virales a été détectée à partir des surnageants de culture (Kit Antigène P27 Coulter).

Nous avons mis en évidence et décrit pour la première fois, l'infection des cellules humaines par le SIVmnd, virus non pathogène pour son hôte naturel. En effet, le SIVmnd infecte préférentiellement les lymphocytes CD4<sup>+</sup>, à J21, et les monocytes dès J7, mais n'infecte pas les lymphocytes CD8<sup>+</sup> et les PBMCs. Au bout de 40 jours de culture, seule la population cellulaire enrichie en lymphocytes CD4<sup>+</sup> ou en monocytes s'infecte avec le SIVmnd et continue à produire du virus. En revanche, l'infection des lignées cellulaires montre une infection des SupT1 et des CEMx174 par le SIVmnd dès J7 celle des Molt4 clone8 est plus tardive et apparaît à J21. La lignée macrophagique U937 n'est pas infectée par le SIVmnd.

Le SIVmnd infecte aussi bien les lymphocytes CD4<sup>+</sup> que les CD8<sup>+</sup>, les monocytes et les PBMCs de son hôte naturel, le mandrill. Le même résultat est observé chez les macaques cynomolgus et rhésus.

# Simian immunodeficiency virus from Mandrill (*Mandrillus sphinx*) SIVmnd experimentally infects human and nonhuman primate cells

Virginie Poaty-Mavoungou<sup>a</sup>, Richard Onanga<sup>a</sup>, Issa Bedjabaga<sup>a</sup>, Elie Mavoungou<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Centre international de recherches médicales de Franceville (CIRMF) B.P. 769, Franceville, Gabon

<sup>b</sup>Centre de recherches de l'hôpital Albert Schweitzer, B.P. 118, Lambaréné, Gabon

<sup>c</sup>Department of Parasitology, Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen, Tübingen, Germany

(Received 5 May 2000; accepted 19 February 2001)

**ABSTRACT** – This study set out to characterize the features of experimental infection by simian immunodeficiency virus in mandrill (SIVmnd) (*Mandrillus sphinx*), cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*), rhesus macaque (*Macaca mulatta*), chimpanzee (*Pan troglodytes*), African green monkey (*Cercopithecus pygerythrus*), baboon (*Papio cynocephalus*) and human cells. Purified cells were exposed to a primary isolate of SIVmnd grown in the infected mandrill peripheral blood mononuclear cells, and viral p27 gag antigen was quantitated by antigen capture ELISA. Human cells have been found to be infected by SIVmnd. SIVmnd infection in cynomolgus macaque, rhesus macaque, baboon, mandrill and human cells were more effective than in vervet and chimpanzee cells. In addition, the lymphocytic cell lines SupT1, CEMx174 and Molt4 clone 8 were consistently infected by SIVmnd, whereas U937, a monocytic cell line, was not. © 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

human primate / nonhuman primate / mandrill / experimental infection

## 1. Introduction

African monkeys can be naturally infected by simian immunodeficiency viruses (SIVs). In contrast to HIV or SIV infection in human or macaque, persistent SIV infections in naturally infected African non-human primates are not associated with clinical signs of immunodeficiency. No SIV infection has been detected in New World primates [1, 2], nor in Asian primate species excluding those held in captivity. As more and more primate lentiviruses are being discovered and molecularly characterized [3–6], there is increasing evidence that cross-species transmission has played a central role in vivo pathogenicity [7–10]. These viruses were named according to the species from which they were isolated. The first SIV was isolated from a captive rhesus monkey (*Macaca mulatta*), an Asian primate species, in a primate center in the US [11]. Following this discovery, extensive studies have detected the presence of SIV infections in several different species of

macaques: SIVcyn in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [12], SIVmne in pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*) [13], and SIVstm in stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*) [14]. However, other studies have suggested that SIV infection does not occur in wild macaques [1, 12–14] and indicated that the infection detected in macaques in US primate centers was the result of trans-species infection from sooty mangabeys (*Cercocebus atys*) [15, 16]. SIVs have been isolated from many African primate species including SIVsmm from the sooty mangabeys [17, 18], SIVagm from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) [1], SIVmnd from mandrill (*Mandrillus sphinx*) [19, 20], SIVcpz from chimpanzee (*Pan troglodytes*) [21, 22], SIVsyk from the sykes monkeys (*Cercopithecus mitis albogularis*) [23], SIVwcm from the white-crowned mangabey monkey (*Cercocebus torquatus lunulatus*) [24], SIVtal from talapoin (*Miopithecus talapoin*) [25] and SIVrcm from the red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) [26]. In African green monkeys, four distinct lentiviruses were previously described, specific to each of the four species [27, 28]. SIV infection has also been demonstrated in yellow baboons (*Papio cynocephalus*) [29, 30]. Two human viruses, HIV-1 and HIV-2 [31, 32], which are both highly pathogenic in

\*Correspondence and reprints: Dr Elie Mavoungou, Department of Parasitology, Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen, Wilhelmstrasse 27, 72074 Tübingen, Germany.  
E-mail address: eliemavoungou@yahoo.fr (E. Mavoungou).



humans [33] are each closely related at the genetic level to nonpathogenic SIVcpz and SIVsm, respectively [21, 34]. The reasons for the lack of pathogenicity of SIVs in their natural host in Africa are not clear. However, the ability of the virus to multiply in the host and the capacity of the host to control the viral infection play an important role in AIDS virus pathogenesis.

A semi-ranging colony of mandrills (*M. sphinx*) was established in 1983 at the Centre international de recherches médicales de Franceville (CIRMF) in Gabon. In 1988, two strains of SIVmnd (SIVmnd GB1 and GB2) obtained from two naturally infected founder mandrills (one male and one female) were isolated and characterized [19, 20]. Phylogenetic and seroepidemiological analysis and behavior surveillance within the colony indicate a predominant male-to-male transmission of SIVmnd, which probably occurred during bouts of interanimal aggression. One case of vertical transmission of SIVmnd was detected from a naturally infected founder female to one of six offspring [35]. According to sequence data, five subgroups of primate lentivirus have been characterized, one of which is formed by SIVmnd. (1) HIV-1 and SIVcpz; (2) HIV-2, SIVmac and SIVsm; (3) SIVagm; (4) SIVsyk; (5) SIVmnd. HIV and SIV enter target cells by forming a complex between the viral envelope protein and two cell-surface membrane receptors: CD4 and seven-span transmembrane chemokine receptor [36–38]. The recombinant envelope proteins from macrophage-tropic HIV and SIV induce a signal through CCR5 on CD4<sup>+</sup> T cells, and that envelope-mediated signal transduction through CCR5 induces chemotaxis of T cells [39]. This chemotactic response may contribute to the pathogenesis of HIV in vivo by chemo-attracting activated CD4<sup>+</sup> cells to sites of viral replication [37, 38]. However, SIVmnd has been reported in the literature to use CXCR4 in contrast to other SIVs [40]. We report here, for the first time, an experimental human cell infection by SIVmnd, although it has been previously described that SIVmnd grows in human T-cell lines [19]. In addition, we present a study on the cellular tropism of SIVmnd, which examines an in vitro infection of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, monocytes/macrophages and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). We also examine the ability of SIVmnd to replicate in these cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and specimens

In this study six monkey species were used. Table 1 shows the monkeys from each species that were tested. Twenty-milliliter samples of EDTA whole blood were collected from monkeys housed at CIRMF, and which were under ketamine anesthesia (10 mg/kg). PBMCs and plasma were separated by centrifugation with lymphocyte separation medium (Organon Teknika, Inc., Durham, NC), as previously described [41]. All animals tested were screened by ELISA mixed Genelavia kits (Sanofi Diagnostic Pasteur) and were negative.

Table 1. Monkeys from each species tested.

Species	Number of tested subjects
Baboon	6
Chimpanzee	4
Cynomolgus	4
Mandrill	4
Rhesus	3
Vervet	6
Human	6

### 2.2. Subjects

The subjects were six consenting adults aged between 21 and 47, from Franceville, in east Gabon. Subjects were approved by the joint scientific and ethical committee of CIRMF and the government of Gabon. All subjects were screened by ELISA mixed Genelavia kits (Sanofi Diagnostic Pasteur) and were HIV negative.

### 2.3. Viral stocks

PBMCs were isolated from venous blood using density gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque. Cells from SIVmnd seronegative mandrills were stimulated with concanavalin A (ConA) and cocultured with PBMCs from seropositive mandrills. Culture supernatants were assayed for p27 gag antigen content and cell-free viral stocks were stored at -80 °C twice weekly. Cultures were considered positive if SIV p27 antigen was detected in culture supernatants. The titer of SIVmnd utilized ( $5.6 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>) was determined using a previously published calculation method [42]. The TCID<sub>50</sub> was defined as the reciprocal of the virus dilution resulting in 50% positive wells. The strain of virus used corresponds to SIVmnd GB1 characterized by Hayami [20].

### 2.4. p27 core antigen assay

Samples from culture supernatant were assayed by p27 antigen Coulter SIV core antigen procedure (Coulter Corporation, Hialeh, FL) with the standard provided in the kit. Briefly, the Coulter SIV Core antigen assay is an enzyme immunoassay using murine monoclonal anti-SIV core antigen p27 coated onto microwell strips, to detect SIV antigens in plasma, serum or tissue-culture media. If present, the antigen binds to the antibody-coated microwells. The bound SIV antigen is recognized by biotinylated human antibodies which recognize SIV and react with conjugated streptavidin horseradish peroxidase. Color develops from the reaction of the peroxidase with hydrogen peroxide in the presence of tetramethylbenzidine substrate. The reaction is terminated by the Coulter Stopping Reagent and the intensity of the color developed is directly proportional to the amount of SIV antigen present in the plasma serum or tissue-culture medium.

### 2.5. T-cell lymphocyte sub-population isolation

Human and monkey PBMCs were treated with a monoclonal antibody and magnetic beads designed to remove CD8<sup>+</sup> cells. IOT8a antibody (Becton Dickinson, France) was added at a 1/50 final dilution and incubated with

Table II. Percentages of cell subsets in the PBMCs of different primates.

Species	Number of tested animals	PBMCs			CD8 depleted PBMCs		
		%CD4	%CD8	%CD4-CD8	%CD4	%CD8	%CD4-CD8
Vervet	6	11.70 ± 2.3	40.57 ± 4.2	7.72 ± 2.1	18.08 ± 3.3	0.21	0.21
Chimpanzee	4	39.27 ± 6.4	46.34 ± 6.1	0.47	78.24 ± 8.9	0.05	0.66
Rhesus	3	24.06 ± 5.2	41.79 ± 9.3	0.48	9.94 ± 3.1	0.42	0.26
Cynomolgus	4	21.76 ± 4.6	58.87 ± 0.6	0.46	8.05 ± 0.8	0.67	0.35
Baboon	6	30.46 ± 3.4	48.83 ± 5.2	0.38	62.28 ± 12	1.00	0.10
Mandrill	4	24.69 ± 2.0	39.95 ± 7.3	0.12	51.12 ± 8.3	0.39	0.12
Human	6	52.54 ± 8.4	26.51 ± 5.7	1.05	69.04 ± 6.0	0.20	0.16

$2 \times 10^7$  PBMCs per mL for 30 min at 4 °C, with gentle agitation. The PBMCs were then washed in RPMI-1640 medium (Biowhittaker, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 200 U/mL penicillin, 200 µg/mL streptomycin (Gibco-BRL, France) and resuspended with beads (two beads per cell) that attach to the cell-bound IOT8a antibody (Dynabeads M450 sheep anti-mouse IgG) (Dyna, Compiègne, France). After incubation for 30 min at 4 °C, the beads were bound to a magnet and CD8<sup>+</sup> cells bound by the magnet were removed.

## 2.6. Monocyte/macrophage isolation

Human and monkey monocytes were prepared from buffy coats of blood by Ficoll-Hypaque separation and subsequent adherence to plastic dishes as previously described [43]. Cells were then purified by using magnetic dynabeads M450 CD2 (pan T) and dynabeads M450 CD19 (pan B) to remove residual T and B lymphocytes. The purified cells were phenotyped with anti-CD2, anti-CD3 and anti-CD19 antibodies to check whether depletion was successful, and were analyzed for their expression of monocyte/macrophage specific markers (CD14, CD11a, CD11b).

## 2.7. Cell staining and immunophenotyping

Staining involved the addition of 10 µL of the relevant monoclonal antibodies, Leu3A a CD4 antibody, or Leu2A, a CD8 antibody (Becton Dickinson, Le Pont de Clais, France) to the wells of a flexible microtiter plate (Falcon 3911, Polylabo, Strasbourg, France). A cell suspension  $10^6$ /mL (250 µL) was added to each well and mixed with antibody by gentle tapping. The plate was then incubated over ice, in the dark, for 30 min. After incubation, three drops of 5% FCS/RPMI (ICN Flow, France) were added to each well and the plate was centrifuged at 160 g for 5 min. The cells were washed twice with four drops of 5% FCS/RPMI and recentrifuged as above. Finally, after resuspending in one drop 5% FCS/RPMI, the cells were stored until needed. Immunophenotyping of cell-surface CD4 and CD8 were performed using a FacsCalibur flow cytometer (Becton Dickinson).

## 2.8. Cell culture

PBMCs were isolated from EDTA-treated whole blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. The mitogens used were either streptococcal exotoxin A (SEA:

5 µg/mL) for vervet (an African green monkey species) cell cultures, ConA (10 µg/mL) for macaque, mandrill, and baboon cultures, lectin PHA-L for chimpanzee cultures; human cell cultures were stimulated with phytohemagglutinin PHA-p. Both cell types were cultured at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, 200 U/mL streptomycin and 40 U/mL interleukin-2 (EuroCetus, Amsterdam, The Netherlands). Cell lines were maintained in RPMI-1640 10% FCS L-glutamine and penicillin/streptomycin.

## 2.9. In vitro infection

Purified human, cynomolgus macaque, rhesus macaque, vervet, baboon, chimpanzee or mandrill PBMCs and SupT1, Molt4 clone 8, CEMx174 and U937 cell lines were exposed to virus suspensions for 2 h at 37 °C, after which the virus/cell cultures were collected and centrifuged for 10 min at 400 g to remove residual viral inoculum. Cell pellets were then suspended in 10 mL of PBS and centrifuged as above; the wash step was repeated twice. Cells were maintained at 37 °C. Aliquots were collected at defined intervals and viral p27 gag antigen in culture supernatant was quantitated by antigen capture ELISA (Immunotech, SA, Marseille, France).

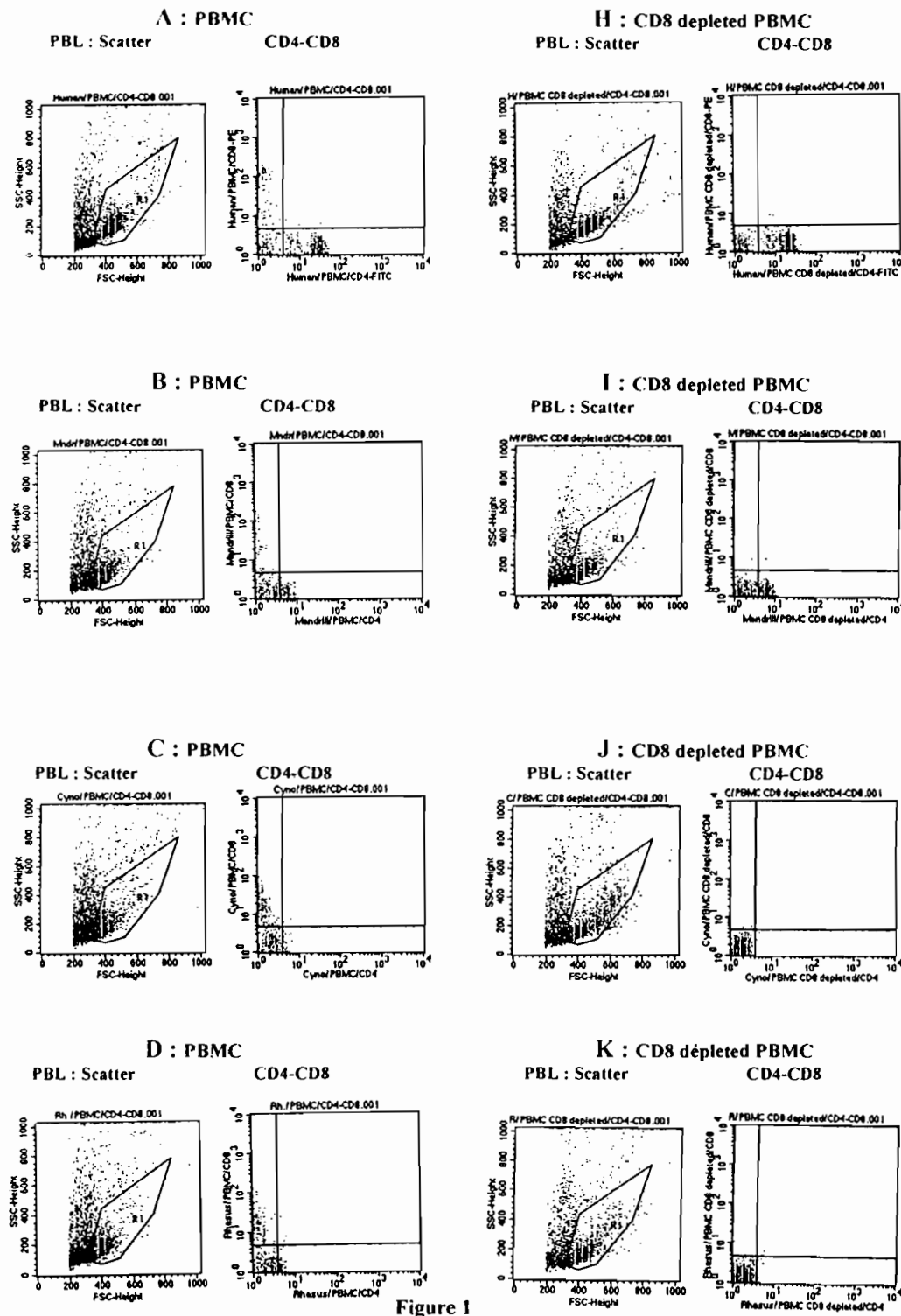
# 3. Results

## 3.1. Simple and dual cell staining

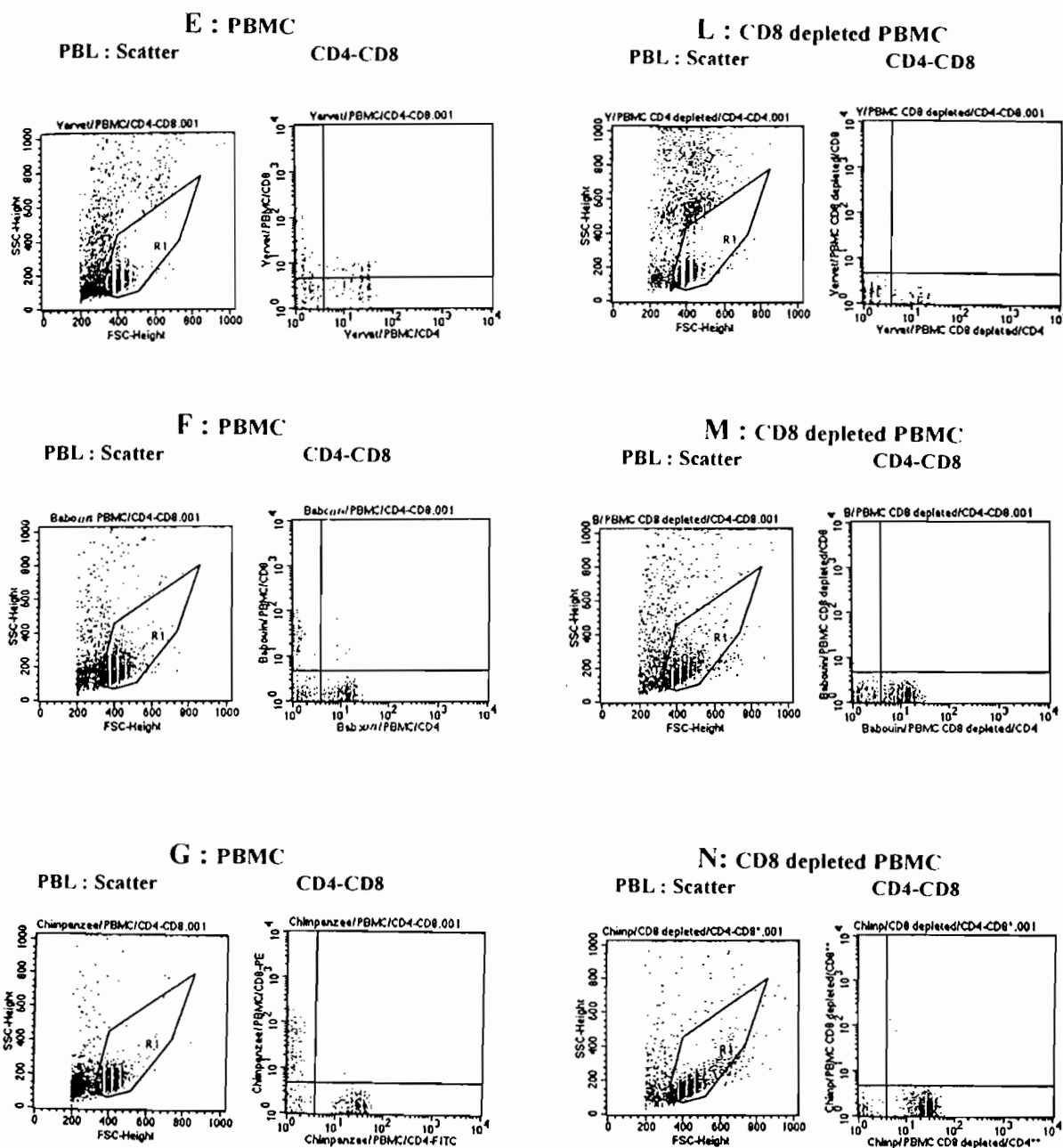
PBMCs and CD8-depleted PBMCs from human and monkey were stained with CD4 or CD8 antibody for the simple staining or CD4-CD8 antibodies for dual staining. Percentages of circulating CD4<sup>+</sup> are higher in humans than in chimpanzees, baboons, mandrills, rhesus macaques, cynomolgus macaques and vervets (table II). Percentages of circulating CD8<sup>+</sup> are higher in vervet than in cynomolgus macaques, baboons, chimpanzees, rhesus macaques and humans (table II). We found that CD4 cells co-express CD8 antigen in vervet (figure 1E). After CD8 depletion, there is a loss in CD4-CD8 in the vervet PBMC dual staining (figure 1L).

## 3.2. In vitro infection of cells with SIV<sub>mn</sub>

We assayed late steps in the infection of human and nonhuman primate (mandrill, cynomolgus macaque, rhesus macaque, baboon, chimpanzee and vervet) cells

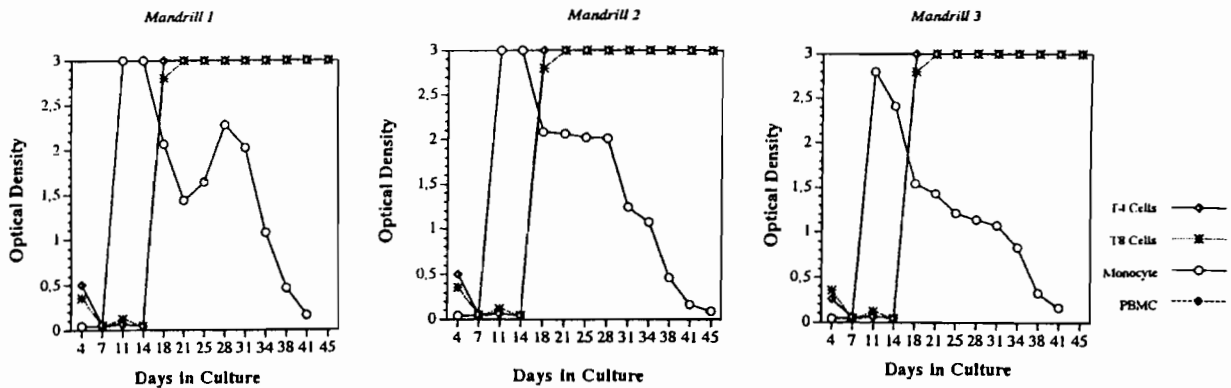


**Figure 1.** CD4 and CD8 expression in freshly isolated human, mandrill, cynomolgus macaque, rhesus macaque, vervet, baboon and chimpanzee PBMCs (A–C) and CD8-depleted PBMCs (H–N). Monkey and human cells were stained with CD4 (FITC-Leu3a) and CD8 (PE-Leu2a). Negative control cells were stained with control PE- and FITC-IgG antibodies. Forward scatter (FSC) versus side scatter (SSC) dot blots are indicated in each panel.



with SIV<sub>mnd</sub>, by measuring p27 core antigen in the culture supernatant. Cell suspensions were exposed to the primary isolate of SIV<sub>mnd</sub> grown in the infected mandrill PBMCs at a dose of  $5.6 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/10<sup>6</sup> leukocytes. After 2 h, cell suspensions were washed thoroughly and cultured in aliquots of 10<sup>7</sup> leukocytes in culture dishes for 38–44 days [44]. SIV<sub>mnd</sub> infection for cynomolgus macaque, rhesus macaque, baboon, mandrill and human cells is markedly different from that found in chimpanzee and vervet cells. SIV<sub>mnd</sub> infects mandrill cells, its natural

host. Although the OD values for p27 reactivity in determining viral infections is qualitative, the level of p27 antigen in culture supernatants was maximal from day 10 to day 45 (figure 2). In human cells, peak levels of viral protein plateau between 18 and 45 days post-infection. The curve of CD4<sup>+</sup> cell infection was di-phasic for humans 1 and 2, but not for the infections in human 3 CD4<sup>+</sup> cells (figure 3). Humans 1, 2 and 3 were three different donors. Infection of cynomolgus macaque, rhesus macaque and baboon cells with SIV<sub>mnd</sub> results in efficient core-antigen



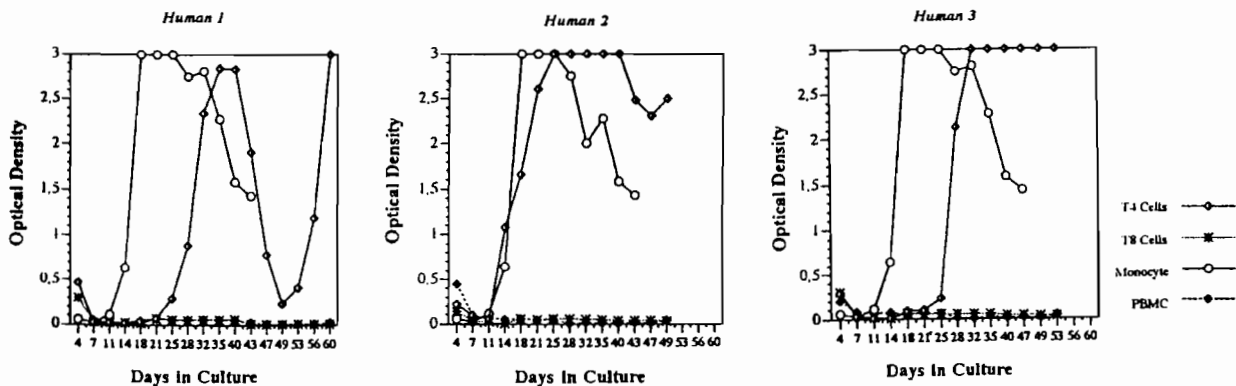
**Figure 2.** SIVmnd replication in mandrill cells. Experiments were performed by adding cell-free SIV to donor cells as described in the Materials and methods.

production. The curves obtained in these cells are virtually identical, with p27 antigen being released from day 10 (figures 4–6). In contrast, although vervet and chimpanzee cells were able to grow in vitro, SIVmnd infection of vervet and chimpanzee cells results in very low production of viral antigen p27 (figures 7 and 8). As previously described by Georges-Courbot et al., [26], the p27 antigen was not quantified in nanograms per milliliter, because the assay is specific for SIVmac and quantification of the p27 of other SIVs would require homologue standards, which are not yet available. Nevertheless, the SIVmac p27 assay was a reliable qualitative assay for infection and was used to show that the virus readily replicated in vitro in human PBMCs. To test SIVmnd tropism, experimental infection of different lymphotropic and monotropic cell lines was done: SupT1, CEMx174, Molt4 clone 8 were consistently infected, whereas the U937 cell line was not (figure 9). The results of three specimens from the human donors, as well as from each species of monkey, and the cell lines were presented above.

#### 4. Discussion

Our study demonstrated that a primary isolate of SIVmnd can consistently infect in vitro mandrill cells, its

natural host, baboon, cynomolgus macaque and rhesus macaque cells, but fails to infect chimpanzee and vervet cells. In addition we have demonstrated for the first time that SIVmnd experimentally infects human cells. In a recent study, others characterized a novel SIV, designated SIVhoest, isolated from an east African monkey. This virus efficiently infected both human and macaque lymphocytes. Phylogenetic analyses showed that SIVhoest is genetically distinct from other previously characterized primate lentiviruses but clusters in the same major lineage as SIVmnd [15]. The lack of SIVmnd infection in vervet and chimpanzee cells could not be due to a lower proliferation or activation state of these cells in comparison to mandrill, macaque, baboon and human cells. In vitro proliferation assays were checked and the experiments were performed in triplicate (data not shown). Moreover, SIVagm infection of vervet cells and SIVcpz infection of chimpanzee cells were used as positive control. However, it is not excluded that another strain of SIVmnd would have been able to replicate in the vervet and chimpanzee cells. We were interested in determining the relative efficiencies of virus production by SIVmnd infected mandrill cells, therefore we measured viral core antigen production as a qualitative parameter for virus output. We also studied



**Figure 3.** SIVmnd replication in human cells. Experiments were performed by adding cell-free SIV to donor cells.

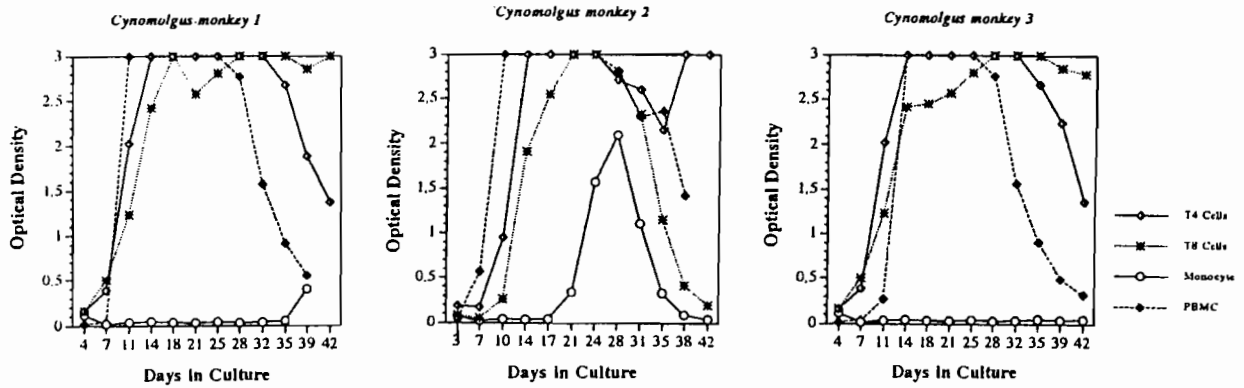


Figure 4. SIV<sub>md</sub> replication in cynomolgus macaque cells. Experiments were performed by adding cell-free SIV to donor cells.

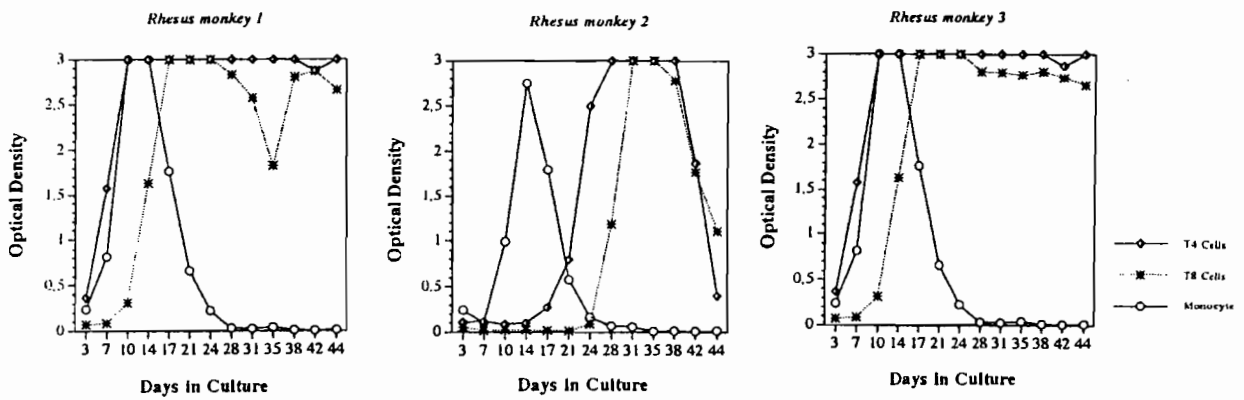


Figure 5. SIV<sub>md</sub> replication in rhesus macaque cells. Experiments were performed by adding cell-free SIV to donor cells.

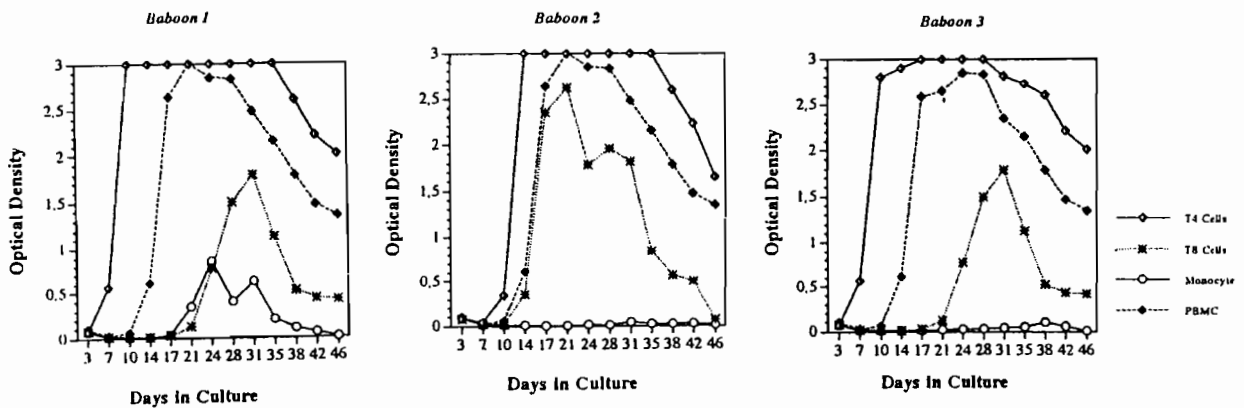


Figure 6. SIV<sub>md</sub> replication in baboon cells. Experiments were performed by adding cell-free SIV to donor cells.

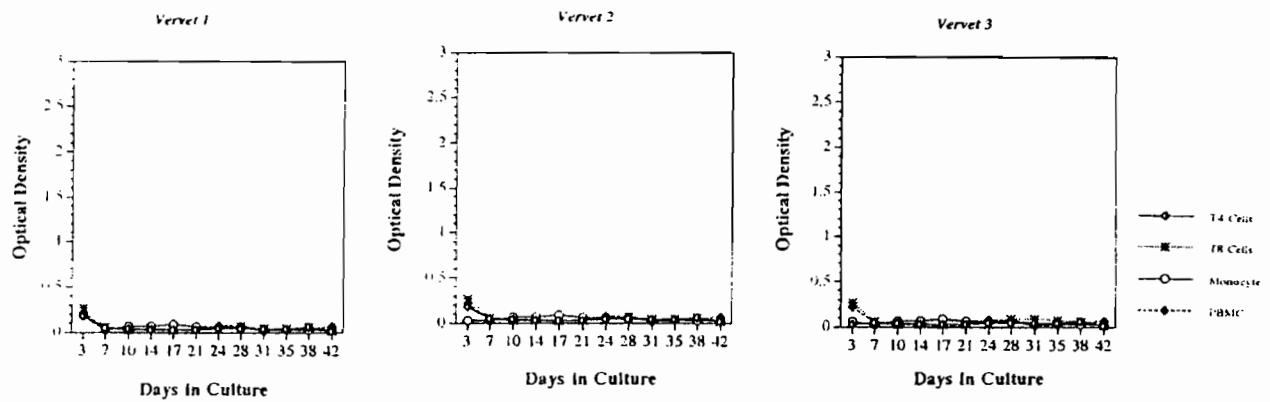


Figure 7. SIVmnd replication in vervet cells. Experiments were performed by adding cell-free SIV to donor cells.

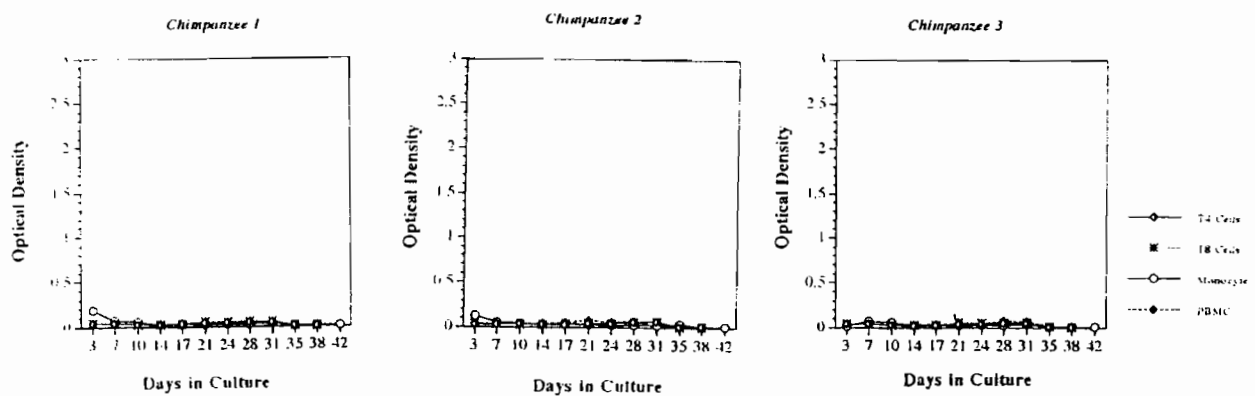


Figure 8. SIVmnd replication in chimpanzee cells. Experiments were performed by adding cell-free SIV to donor cells.

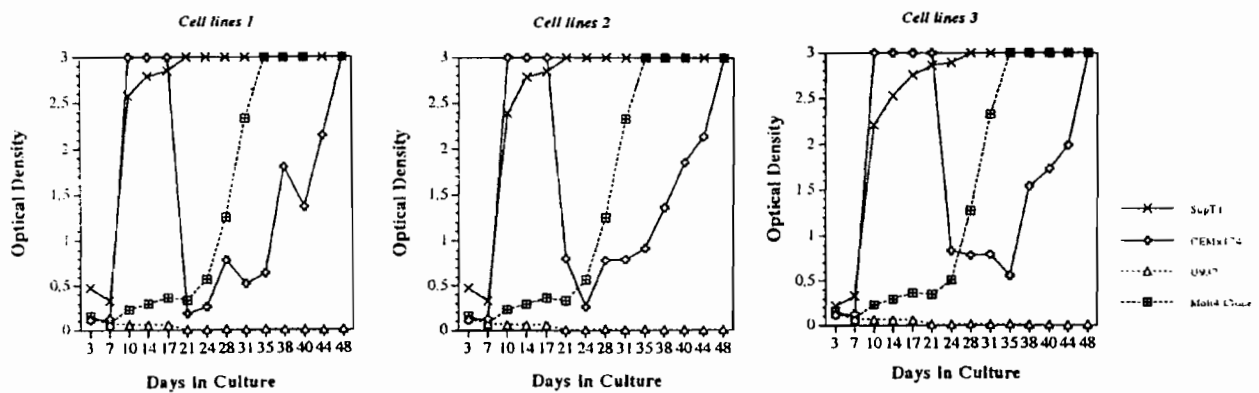


Figure 9. SIVmnd replication in different cell lines cells. Experiments were performed by adding cell-free SIV to donor cells.

the tropism of SIV<sub>mnd</sub> infection. In mandrill, the replication of SIV<sub>mnd</sub> leads to specific degradation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, monocytes and PBMCs. Virus could be recovered from day 11 to day 45. In macaque, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes were transiently infected from days 24 to 31 for cynomolgus macaque, and from days 10 to 19 for rhesus macaque. In baboon, SIV<sub>mnd</sub> consistently infects CD4<sup>+</sup> cells from day 12, PBMCs from day 14, CD8<sup>+</sup> cells from day 15 and transiently infects monocytes. Interestingly, we found that in experimental infection of human cells with SIV<sub>mnd</sub> the high amount of viral production by CD4<sup>+</sup> cells is from days 10 to 48; monocytes were infected from days 14 to 42; however, human PBMCs and CD8<sup>+</sup> cells were not infected by SIV<sub>mnd</sub>. It was previously shown that SIV<sub>lhoest</sub> grows in human and monkey cells [15], SIV<sub>agm</sub> in vervet cells [45], HIV-1 in chimpanzee cells [46], SIV<sub>mac</sub> in rhesus and cynomolgus monkey cells [11]. One striking observation in our investigations has been the relative difficulty in measuring viral protein from PBMCs. In the human subjects, p27 could be measured from PBMCs after depletion of CD8<sup>+</sup> cells before culture. This finding reflects the ability of CD8<sup>+</sup> lymphocyte to suppress virus replication [47–50]. CD4 is expressed on T-helper cells, monocytes and peripheral blood dendritic cells [51, 52]. Although monocytes express CD4 and the activation marker HLA-DR [53, 54] there is evidence for extensive infection of these cells with HIV or SIV. Estimates of the frequency of infected monocytes in the peripheral circulation have ranged from zero to 100 per million of total cells [55, 56]. Although CD8 lymphocytes do not express CD4, *in vitro* infection of CD8 lymphocytes has been achieved by co-culture with HIV-1-infected CD4 cells [57]. The interaction between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells occurring *in vivo* as part of the immune response may transmit infection to CD8 lymphocytes. An alternative explanation is suggested by studies in SCID mice (severe combined immunodeficiency), which indicate that infection of human progenitor T cells may occur in the thymus of infected animals during normal selection for both antigen specificity and coreceptor (CD4 or CD8) expression [58]. As we show in *figure 1E*, it was known that African green monkeys have dual staining CD4/CD8 lymphocyte populations [45]. Another alternative explanation for widespread infection of CD8 cells is that SIV<sub>mnd</sub> can infect cells through a non-CD4-dependent mechanism of virus attachment and entry. CD8<sup>+</sup> lymphocytes, in common with CD4<sup>+</sup> lymphocytes and macrophages express the CC-CKR5 receptor, which has been identified as a second receptor for non-syncytium-inducing variants of HIV-1 and SIV [59–61]. However, human CD8<sup>+</sup> cells were not actually infected. These results together with the fact that we have demonstrated the consistent SIV<sub>mnd</sub> infection of SupT1, CEMx174 and Molt4 clone 8, three lymphotropic cell lines, and the defective infection of U937, a monocytic cell line, suggest that SIV<sub>mnd</sub> should be a lymphotropic strain. Nevertheless, the replication of SIV<sub>mnd</sub> in a human CD4<sup>+</sup> cell line does not indicate whether the strain is not monocytotropic, since it has been reported that SIV viruses grow efficiently in transformed T-cell lines, regardless of phenotype and tropism for macrophages [62]. Different

primates have substantial quantitative differences in T-cell lymphocyte sub-populations in the peripheral blood. Normal values of absolute numbers of circulating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells are higher in chimpanzees than in humans and macaques [63–66]. As previously shown, chimpanzees, African green monkeys and sooty mangabeys also have a higher percentage of circulating cells [67–70] and a lower CD4/CD8 ratio than human and rhesus macaques [24]. A greater number of CD8<sup>+</sup> cells in the peripheral blood could reflect different proportions of CD8<sup>+</sup> cells which may play a protective role against development of disease by various immunological pathways. However, as some macaque species with relatively high peripheral blood CD8<sup>+</sup> cell percentages (pig-tailed macaques, cynomolgus macaques, rhesus macaques) have been found to be susceptible to lentiviral disease [5] and as African green monkeys have been found to express dual staining CD4/CD8 lymphocyte populations, these possible quantitative differences in functional CD8<sup>+</sup> subsets in primates and their influence on the course of lentivirus infection remain to be evaluated in the context of SIV<sub>mnd</sub> infection. Since mandrill is a nonpathogenic model, the *in vivo* cross-species transmission of SIV<sub>mnd</sub> also remains to be evaluated. Indeed, it was previously shown that in one experimental cross-species transmission from sooty mangabey to pig-tailed macaque, the parental virus (SIV<sub>smm9</sub>), non-pathogenic in the original host (sooty mangabeys), causes a chronic AIDS-like disease in various macaques. In contrast, the variant virus (SIV<sub>smmPBj14</sub>) induces an acute lethal disease in various macaque species and is also pathogenic for sooty mangabeys [71].

## Acknowledgments

We thank the three anonymous reviewers whose comments greatly improved this paper. The Centre international de recherches médicales de Franceville (CIRMF) is supported by the State of Gabon, and by funds provided by TotalFina Elf Gabon Company and le Ministère de la Coopération Française.

## References

- [1] Ohta Y., Masuda T., Tsujimoto H., Ishikawa K., Kodama T., Morikawa S., Nakai M., Honjo S., Hayami M., Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates, *Int. J. Cancer* 41 (1988) 115–122.
- [2] Andrada-Serpa M.J., Tosswill J., Schor D., Linhares D., Dobbin J., Pereira M.S., Seroepidemiological survey for antibodies to human retroviruses in human, non human primate in Brazil, *Int. J. Cancer* 44 (1989) 389–393.
- [3] 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., Sharp P.M., Hahn B.M., Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology, *J. Virol.* 68 (1994) 7433–7447.



- [4] Gürtler L.G., Hauser P.H., Eberle J., Von Brunn A., Knapp S., Zekeng L., Tsague J.M., Kaptue L., A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon, *J. Virol.* 68 (1994) 1581–1585.
- [5] Hirsch V.M., Dapolito G., Goldstein S., McClure H., Emau P., Fultz P.N., Isahakia M., Lenroot R., Myers G., Johnson P.R., A distinct African lentivirus from Sykes monkeys, *J. Virol.* 67 (1993) 1517–1528.
- [6] Vanden Haesevelde M., Decourt J.L., De Leys R.J., Vander-Borghet B., Van Der Groen G., Van Heuverswijn H., Saman E., Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate, *J. Virol.* 68 (1994) 1586–1596.
- [7] Derosiers R.C., The simian immunodeficiency viruses, *Annu. Rev. Immunol.* 8 (1990) 557–558.
- [8] Leigh Brown A.J., Holmes E.C., Evolutionary biology of human immunodeficiency virus, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25 (1994) 127–162.
- [9] Nathanson N., McGann K.A., Wilesmith J., Derosiers R.C., Brookmeyer R., The evolution of virus disease: their emergence, epidemicity and control, *Virus Res.* 23 (1993) 3–20.
- [10] Sharp P.M., Robertson D.L., Gao F., Hahn B.H., Origins and diversity of human immunodeficiency viruses, *AIDS* 8 (suppl. 1) (1994) S27–S42.
- [11] Daniel M.D., Letvin N.L., King N.W., Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques, *Science* 228 (1985) 1201–1204.
- [12] Daniel M.D., Letvin N.L., Sehgal P.K., Schmidt D.K., Silva D.P., Solomon K.R., Hodi R.F.S., Ringler D.J., Hunt R.D., King N.W., Derosiers R.C., Prevalence of antibodies to 3 retroviruses in a captive colony of macaque monkeys, *Int. J. Cancer* 41 (1988) 601–608.
- [13] Benveniste R.E., Arthur L.O., Tsai C.C., Sowder R., Copeland T.D., Henderson L.E., Oroszlan S., Isolation of a lentivirus from a macaque with lymphoma: Comparison with HTLVIII/LAV and other lentivirus, *J. Virol* 60 (1986) 483–490.
- [14] Lowenstine L.J., Pedersen N.C., Higgins J., Pallis K.C., Uyeda A., Marx P., Lerche N.W., Munn R.J., Gardner M.B., Seroepidemiologic survey of captive Old World primates for antibodies to human and simian retroviruses, and isolation of a lentivirus from sooty mangabeys (*Cercocebus atys*), *Int. Cancer* 38 (1986) 563–574.
- [15] Hirsch V.M., Campbell B.J., Bailes E., Goeken R., Brown C., Elkins W.R., Axthelm M., Murphey-Corb M., Sharp P.M., Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIV) from the hoest monkeys (*Cercopithecus l'hoesti*): implications for the origins of SIV<sub>mn</sub> and other primate lentiviruses, *J. Virol.* 73 (1999) 1036–1045.
- [16] Murphey-Corb M., Martin L.N., Rangan S.R.S., Baskin G.B., Gormus B.J., Wolf R.H., Andes W.A., West M., Montalano R.C., Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys, *Nature* 321 (1986) 435–437.
- [17] Fultz P.N., McClure H.M., Anderson D.C., Swenson R.B., Isolation of a T lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 5286–5290.
- [18] Lowenstine L.J., Lerche N.W., Marx P., Gardner M.B., Pedersen N.C., An epizootic of simian AIDS caused by SIV in captive macaques in 1970's, in: Gerar V. (Ed.), *Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Viruses*, Pasteur Vaccines, Paris, 1988, pp. 174–176.
- [19] Tsujimoto H., Cooper R.W., Kodama T., Fukusawa M., Miura T., Ohta Y., Ishikawa K., Nakai M., Frost E., Roelants G.E., Roffi J., Hayami M., Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses, *J. Virol.* 62 (1988) 4044–4050.
- [20] Tsujimoto H., Hasegawa A., Maki N., Fukasawa M., Miura T., Speidel S., Cooper R.W., Moriyama E.N., Gojobori T., Hayami M., Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill, *Nature* 341 (1989) 539–541.
- [21] Huet T., Cheynier R., Meyerhans A., Roelants G., Wain-Hobson S., Genetic organisation of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1, *Nature* 345 (1990) 356–359.
- [22] Peeters M., Honore C., Huet T., Bedjabaga I., Ossari S., Bussi P., Cooper R.W., Delaporte E., Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon, *AIDS* 3 (1989) 625–630.
- [23] Emau P., McClure H.M., Isahakia M., Elses J.G., Fultz P.N., Isolation from African sykes monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses, *J. Virol.* 65 (1991) 2135–2140.
- [24] Terao K., Rose L.M., Sackett G.P., Clark E.A., Development of lymphocyte subsets in pig-tailed macaques, *Hum. Immunol.* 21 (1988) 33–48.
- [25] Bosch M., Pedersen N., Amerongen G.V., Ready E., Marthas M., Rose T., Frankenhuis M., Osterhaus A.D.M.E., Identification and partial characterization of a lentivirus from talapoin monkeys, *J. Med. Primatol.* 23 (1984) 233–238.
- [26] Georges-Courbot M.C., Lu C.Y., Makuwa M., Telfer P., Onanga R., Dubreuil G., Chen Z., Smith S.M., Georges A., Gao F., Hahn B.H., Marx P.A., Natural infection of a household pet red-capped mangabey (*cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus, *J. Virol.* 72 (1998) 600–608.
- [27] Allan J.S., Short M., Taylor M.E., Su S., Hirsch V.M., Johnson P.R., Shaw G.M., Hahn B.H., Species specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys, *J. Virol.* 65 (1991) 2816–2828.
- [28] Müller M.C., Saksena N.K., Nerrienent E., Chappey C., Hervé V.M.A., Durand J.P., Legal Campodonico P., Lang M.C., Digoutte J.P., Georges A.J., Georges-Courbot M.C., Sonigo P., Barré-Sinoussi F., Simian immunodeficiency viruses from Central and Western Africa: evidence for a new species-specific lentivirus in tantalus monkeys, *J. Virol.* 67 (1993) 1227–1235.
- [29] Jin M.J., Rogers J., Philips-Conroy J.E., Allan J.S., Derosiers R., Shaw G.M., Sharp P.M., Hahn B., Infection of a yellow baboon with simian immunodeficiency virus from West African monkeys: evidence for cross species transmission in the wild, *J. Virol.* 68 (1994) 8454–8460.

- [30] Kodama T., Silva D.P., Daniel M.D., Philips-Conroy J.E., Jolly C.J., Rogers J., Desrosiers R.C., Prevalence of antibodies to SIV in baboons in their native habitat, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5 (1989) 337–343.
- [31] Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest F., Dauguer C., Axler-Blin C., Brun-Vezinet F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), *Science* 220 (1983) 868–871.
- [32] Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M.A., Santos-Ferreira M.O., Laurent A.G., Dauguer C., Katlama C., Rouzioux C., Klatzmann D., Champsalimaud J.L., Montagnier L., Isolation of new human retrovirus from a West African patient with AIDS, *Science* 233 (1986) 343–346.
- [33] Broder S., Merigna T.C. Jr, Bolognesi D., *Textbook of AIDS Medicine* Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- [34] Hirsch V., Olmsted R.A., Murphey-Corb M., Purcell R.H., Johnson P.R., An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2, *Nature* 339 (1989) 389–391.
- [35] Nerrienet E., Amouretti X., Müller-Trutwin M.C., Poaty-Mavoungou V., Bedjabaga I., Nguyen H.T., Dubreuil G., Corbet S., Wickings E.J., Barré-Sinoussi F., Georges A.J., Georges-Courbot M.-C., Phylogenetic analysis of SIV and STLV type I in mandrills (*Mandrillus sphinx*): Indications that intracolony transmissions are predominantly the results of male-to-male aggressive contacts, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14 (1998) 785–796.
- [36] D'Souza M.P., Harden V.A., Chemokines and HIV-1 second receptors, *Nat. Med.* 2 (1997) 1293–1300.
- [37] Fauci A.S., Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease, *Nature* 384 (1996) 529–534.
- [38] Murphy P.M., Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis, *Cytokine Growth Factor Rev.* 7 (1996) 47–64.
- [39] Weissman D., Rabin R.L., Arthos J., Rubbert A., Dybul M., Swofford R., Venkatesan S., Farber J.M., Fauci A., Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor, *Nature* (1997) 981–985.
- [40] Schols D., Este J.A., Cabrera C., De Clercq E., T-cell line tropic human immunodeficiency virus type 1 that is made resistant to stromal cell-derived factor 1 alpha contains mutations in the envelope gp120 but does not show a switch in co-receptor use, *J. Virol.* 67 (1998) 5713–5720.
- [41] Chen Z., Telfer P., Reed P., Gettie A., Zhang L., Ho D.D., Marx P., Genetic characterization of west African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop, *J. Virol* 70 (1996) 3617–3624.
- [42] Norley S.G., Lower J., Kurth R., Insufficient inactivation of HIV-1 in human cryo poor plas by beta-propiolactone: results from a highly accurate virus detection method, *Biologicals* 21 (1993) 251–258.
- [43] Nain M., Hinder F., Gong J.H., Schmidt A., Bender A., Grenger H., Gemsa D., Tumor necrosis factor-alpha production of influenza virus-infected macrophages potentiating effect of lipopolysaccharides, *J. Immunol.* 145 (1990) 1921–1928.
- [44] Pope M., Gezelter S., Gallo N., Hoffman L., Steinman R.M., Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4<sup>+</sup> T cells, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 2045–2056.
- [45] Murayama Y., Amano A., Mukai R., Shibata H., Matsunaga S., Takahashi H., Yoshikawa Y., Masanori H., Nogushi A., CD4 and CD8 expressions in African green monkey helper T lymphocytes: implication for resistance to SIV infection, *Int. Immuno.* 9 (1997) 843–851.
- [46] Novembre F.J., Saucier M., Anderson D.C., Klum S.A., O'Neil S.P., Brown C.R.I.I., Hart C.E., Guenther P.C., Swenson R.B., McClure H.M., Development of AIDS in a chimpanzee infected with human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 71 (1997) 4086–4091.
- [47] Brinchmann J.E., Gaudernack G., Vartdal F., Evidence for a soluble inhibitor, CD8<sup>+</sup> T cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4<sup>+</sup> T cells, *J. Immunol.* 148 (1990) 2961–2966.
- [48] Castro B.A., Walker C.M., Eichberg J.W., Levy J.A., Suppression of human immunodeficiency virus replication by CD8<sup>+</sup> cells from infected and uninfected chimpanzees, *Cell. Immunol.* 132 (1991) 246–255.
- [49] Ennen J., Norley S., Kurth R., The activated CD8 T-lymphocyte-derived immunodeficiency-virus-suppressing lymphokine in African green monkeys: evidence for a role in control of infection? *Res. Immunol.* 145 (1994) 647–652.
- [50] Walker C.M., Moody D.J., Stites D.P., Levy J.A., CD8<sup>+</sup> T lymphocyte control of HIV replication in cultured CD4<sup>+</sup> cells varies among infected individuals, *Cell. Immunol.* 119 (1989) 470–475.
- [51] O'Doherty U., Steinmen R.M., Peng M., Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 1067–1076.
- [52] Weissmann D., Li Y.X., Ananworanich J., Three populations of cells with dendritic morphology exist in peripheral blood, only one of which is infectable with human immunodeficiency virus type 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 826–830.
- [53] Collman R., Godfrey B., Cutilli J., Macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus type 1 utilize the CD4 receptor, *J. Virol.* 64 (1990) 4468–4476.
- [54] Levy J.A., Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection, *Microbiol. Rev.* 57 (1983) 183–189.
- [55] Schnitman S.M., Psallidopoulos M.C., Lane H.C., The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4, *Science* 245 (1989) 305–308.
- [56] Schrier R.D., McCuthan J.A., Wiley C.A., Mechanisms of immune activation of human immunodeficiency virus in monocytes/macrophages, *J. Virol.* 67 (1993) 5713–5720.

- [57] Deng H., Liu R., Ellmeir W., Choe S., Unitmatz D., Burkhart M., Di Marzio P., Marmon S., Sutton R.E., Hill C.M., Davis C.B., Peiper S.C., Schall T.J., Littman D.R., Landau N.R., Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1, *Nature* 381 (1996) 661–666.
- [58] Su L., Kaneshima L., Bonyhadi M., HIV-induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathicity and infection of progenitor cells *in vivo*, *Immunity* 2 (1995) 25–31.
- [59] De Maria A., Pantaleo G., Schnittman S.M., Infection of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes with HIV. Requirements for interaction with infected CD4<sup>+</sup> cells and induction of infectious virus from chronically infected CD8<sup>+</sup> cells, *J. Immunol.* 146 (1991) 220–226.
- [60] Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., HIV-1 entry in CD4<sup>+</sup> cell is mediated by the chemokine receptor CC-CKR5, *Nature* 381 (1996) 667–673.
- [61] Zhiwei C., Zhou P., Landau N.R., Marx P.A., Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as co-receptor for entry, *J. Virol.* 67 (1997) 2705–2714.
- [62] Chen Z., Zhou P., Ho D.D., Landau N.R., Marx P.A., Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR coreceptor for entry, *J. Virol.* 71 (1997) 2705–2714.
- [63] Eichberg J.W., Montiel M.M., Morale B.A., King D.E., Chanch T.C., Kennedy R.C., Dreesman G.R., Lymphocyte subsets in chimpanzees, *Lab. Anim. Sci.* 38 (1988) 197–198.
- [64] Bofill M., Janossy G., Lee C.A., MacDonald-Burns D., Philips A.N., Sabin C., Timms A., Johnson M.A., Kernoff P.B.A., Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV diagnosis, *Clin. Exp. Immunol.* 88 (1992) 243–252.
- [65] Ahmed-Ansari A., Brodie A.R., Fultz P.N., Anderson D.C., Sell K.W., McClure M., Flow microfluorometric analysis of peripheral blood mononuclear cells from nonhuman primate: correlation of phenotype with immune function, *Am. J. Primatol.* 17 (1989) 107–131.
- [66] Poaty-Mavoungou V., Yaba P., Délicat A., Dubreuil G., Mavoungou E., Comparative analysis of natural killer cell activity, lymphoproliferation and lymphocyte surface antigen expression in nonhuman primate housed at the CIRMF Primate Center, Gabon, *J. Med. Primatol.* 30 (2001) in press.
- [67] Buijs L., Bogers W.M., Eichberg J.W., Heeny J.L., CD8<sup>+</sup> cell-mediated immune responses: relation to disease resistance and susceptibility in lentivirus-infected primates, *J. Med. Primatol.* 26 (1997) 129–138.
- [68] Hirsch V.M., Dapolito G., Johnson P.R., Elkins W.R., London W.T., Montali R.J., Goldstein S., Brown C., Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of *in vivo* replication, *J. Virol.* 69 (1995) 955–967.
- [69] Letvin N.L., Daniel M.D., Sehgal P.K., Desrosiers R.C., Hunt R.D., Waldron R.M., Mackey J.J., Schmidt D.K., Chalifou L.V., King N.W., Induction of AIDS-like disease in macaques with T-cell tropic retrovirus STLV-III, *Science* 230 (1985) 71–73.
- [70] Sittes D.P., Moss A.R., Bachetti P., Osmond D., McHugh T.M., Jane Wang Y., Herbert S., Colfer B., Lymphocyte subset analysis to predict progression to AIDS in a cohort of homosexual men in San Francisco, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52 (1989) 96–103.
- [71] Courgnaud V., Laure F., Fultz P.N., Montagnier L., Brechot C., Sonigo P., Genetic differences accounting for evolution and pathogenicity of simian immunodeficiency virus from a sooty mangabey monkey after cross-species transmission to a pig tailed macaque, *J. Virol.* 66 (1992) 414–419.

**Deuxième partie :**

**Etude de la primo-infection et de la phase chronique  
chez les mandrills infectés par SIVmnd-1**

## 1. Primo-infection SIVmnd-1 chez *Mandrillus sphinx* :

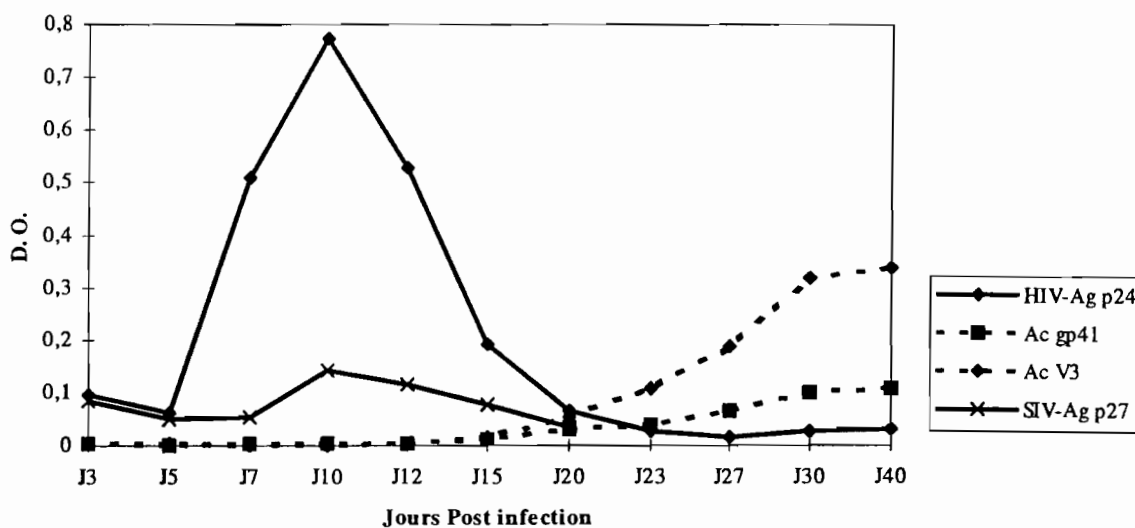
### 1.1. Préparation du stock viral

Nous avons préparé le stock viral à partir du virus original de la mandrill 17, infecté naturellement depuis plus de 15 ans. 1 ml de plasma de cet animal a été titré sur les cellules de lignées SupT1, en dilution limite. L'antigénémie a été détectée à J 14, et le titre (4 TCID50) nous a été donné par calcul en utilisant la méthode de Karber.

10 ml de sang total prélevé sur EDTA du mandrill 17 ont été injectés à un mandrill 16E séronégatif. Le suivi de l'infection durant la primo-infection du mandrill 16E; s'est effectuée à J0, J3, J5, J7, J10, J12, J15, J20, J23, J27, J30, J40.

Les résultats sont présentés sur la Figure 15

Primo Infection du Mnd 16E infecté par 10 ml du Mnd 17: suivi virologique Ag et Ac



### Conclusions

Cette étude nous a permis ;

\* de réaliser l'infection du mandrill par le SIVmnd-1 à partir du sang total du mandrill 17, et de retenir le plasma 16E à J 10 correspondant au pic d'antigénémie comme source virale pour les futures inoculations. Ce stock a été titré sur les cellules SupT 1 par la méthode en dilution limite, et le titre a été déterminé à J 14 en mesurant l'activité de la RT, et par calcul selon la méthode de Karber, le titre obtenu est de 3000 TCID50/ml de plasma.

\* d'établir un calendrier de prélèvement en fonction de la cinétique de réplication virale obtenu.

\* de fixer avec précision les outils du suivi de la charge virale, ainsi une meilleure sensibilité a été obtenue pour le test VIH-Ag-p24 par rapport au test SIV-p27. Par ailleurs, les techniques de RT-PCR (qualitative), PCR, ainsi que les cultures plasmatiques sur SupT1 se sont montrées beaucoup plus sensibles, car elles ont permis de détecter la présence de virus alors que l'antigénémie plasmatique était négative.

\* de montrer que nous avons eu de meilleurs résultats quant au suivi de la séroconversion avec les peptides spécifiques de SIVmnd Ac anti-gp41 et anti-V3, qu'avec le Kit ELISA Genelavia mixt.

## 1.2. Cinétique de la charge virale, de la réponse immune humorale et cellulaire

### Article 4:

High Viral Replication Contrasts with Moderate Changes in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Cell Numbers During SIVmnd-1 primary infection in *Mandrillus sphinx*

**Richard Onanga**, Christopher Kornfeld, Ivona Pandrea, Jérôme Estaquier, Sandrine Souquière, Pierre Rouquet, Virginie Poaty Mavoungou, Olivier Bourry, Souleymane M'Boup, Françoise Barré-Sinoussi, François Simon, Cristian Apetrei, Pierre Roques and Michaela C. Müller-Trutwin

2001. J. Virol, soumis.

Nous avons entrepris l'étude de la dynamique du SIVmnd-1 au cours de la primo-infection chez le mandrill. Le SIVmnd-1 a été obtenu de son hôte naturel, la mandrill 17, asymptomatique pendant 15 ans après infection. Quatre mandrills ont été inoculés par voie intraveineuse avec 3000 TCID50 de SIVmnd-1. Des prélèvements réguliers de sang et de ganglions ont été effectués tous les 3 ou 4 jours sur les animaux, à 6 mois, puis jusqu'à un an. Ces prélèvements ont été analysés par des méthodes sérologiques, par isolement viral et par quantification de l'antigène p24, de l'activité RT et de la charge virale ARN, aussi bien que le suivi de la dynamique des CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le sang et les ganglions.

Les anticorps anti-gp36 et anti-V3 ont été détectés à partir des jours 28-32.

La virémie plasmatique a été détectée dès J 4 post-infection (pi) et le pic de la réplication virale est obtenu entre J 7 et J 10, les valeurs *maxima* et *minima* en antigène p24 sont respectivement de (46,79 - 8,60) pg/ml à J 7 et de (29,26 - 8,29) pg/ml à J 10, en RT de (92,5 - 16,3) pg/ml à J 7 et de (97,8 - 13,9) pg/ml à J 10 au pic, et  $2 \times 10^6$ - $2 \times 10^8$  RNA équivalents/ml. Aucune augmentation significative de fièvre, de poids (Figures 13 et 14) et de la taille des ganglions n'ont été détectés, car la température et le poids sont restés stables au cours de l'infection. Après ce pic, la charge virale chute rapidement et se stabilise autour de  $2 \times 10^5$  RNA Equivalents/ml. Les anticorps anti-gp41 et anti-V3 ont été détectés à partir de J 28 à J 32. Nous n'avons pas observé de modifications significatives du nombre et du pourcentage de CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ou encore du ratio CD4/CD8 dans les deux compartiments étudiés (périphérique et ganglionnaire). Les animaux demeurent en bonne santé jusqu'à ce jour, avec des titres en anticorps élevés et une charge virale stable.

En conclusion, nous avons montré qu'au cours de la primo-infection SIVmnd-1 chez le mandrill, l'évolution des paramètres virologiques et cellulaires indiquent:

-Une réplication rapide et durable du SIVmnd-1 durant la primo-infection.

-Une réplication élevée et persistante pendant la phase chronique, similaire à celle qui est trouvée pendant la phase aiguë dans l'infection SIVagm chez le singe *sabaeus* et dans l'infection chronique SIVsm chez le mangabé, mais tout à fait différente de celle observée chez le modèle pathogène SIVmac251.

•En dépit de ce haut niveau de réplication virale, les taux de cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> présentent de petites variations renforçant les questions concernant la susceptibilité des cellules de mandrills à une activation immunitaire et/ou à la mort cellulaire au cours de l'infection SIVmnd-1 *in vivo*.

•Aussi en dépit de son origine exogène, le SIVmnd-1 semble adapté au mandrill.

# High Viral Replication Contrasts with Moderate Changes in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Cell Numbers During SIVmnd-1 Primary Infection in *Mandrillus sphinx*

-----

Richard Onanga<sup>1</sup>, Christopher Kornfeld<sup>2</sup>, Ivona Pandrea<sup>1</sup>, Jerome Estaquier<sup>3</sup>, Sandrine Souquière<sup>1</sup>, Pierre Rouquet<sup>4</sup>, Virginie Poaty Mavoungou<sup>1</sup>, Olivier Bourry<sup>4</sup>, Souleymane M'Boup<sup>5</sup>, Françoise Barré-Sinoussi<sup>2</sup>, François Simon<sup>1,6</sup>, Cristian Apetrei<sup>1\*</sup>, Pierre Roques<sup>1</sup>, and Michaela C. Müller-Trutwin<sup>2</sup>

Laboratoire de Rétrovirologie,<sup>1</sup> and Centre de Primatologie,<sup>3</sup> Centre International de Recherches Médicales, BP769, Franceville, Gabon; Unité de Biologie des Rétrovirus, Institut Pasteur, 29, Rue Dr. Roux, 75724 PARIS Cedex 15, France<sup>2</sup>; INSERM EMI 9922, Hospital Bichard- Claude Bernard, Paris VII, Paris, France<sup>3</sup>; Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal<sup>5</sup>; Laboratoire de Virologie, Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Charles Nicolle, Rouen, France<sup>6</sup>

**Running head:** SIVmnd-1 Primary Infection in *Mandrillus sphinx*

**\*Corresponding author.**

**Present address:** Laboratoire de Rétrovirologie, Centre International de Recherches Médicales, (CIRMF) Franceville, BP 769, Gabon.

**Phone:** +241 67.72.95

**Fax:** +1 309.296.96.96

**E-mail:** apetrei@cirmf.sci.ga



## Abstract

The non-pathogenic nature of SIV infection in African non-human primates may be the result of the co-evolution of the virus with its respective host. Conversely, cross-transmitted viruses can show increased pathogenicity, as observed for SIVsm/SIVmac in macaques. SIVmnd-1 is a virus from *C. lhoesti* cross-transmitted to mandrills. However, as we have shown by epidemiological studies, this cross-transmission event seems ancient and the virus may now be adapted to its host. As early virus-host interactions predict the level of viral control and disease progression in HIV-1 infected humans, we investigated the dynamics of SIVmnd-1 primary infection in mandrills. SIVmnd-1 virus was obtained from its naturally infected host which was asymptomatic for at least 15 years after the infection. Four monkeys were inoculated intravenously with 3000 TCID<sub>50</sub> of a wild-type SIVmnd-1 that had never been cultured *in vitro*. Two control mandrills were not infected. All animals were followed regularly in blood and lymph nodes (LN) at three time points before infection, during the primary infection, and at days 60, 180 and 360 post-infection (p.i.). Anti-gp36 and anti-V3 antibodies were detected starting from days 28-32 p.i.. Neither fever nor increase in the lymph node size was observed. Plasma viremia was detected as soon as day 4 post-infection and reached highest levels by days 7-10 (RNA: 2x10<sup>6</sup>-2x10<sup>8</sup> equivalents/ml). After this peak of viral replication, plasma viremia decreased in all four animals to values similar to that determined during the chronic phase of infection in the naturally infected donor mandrill (2x10<sup>5</sup> RNA Equivalents/ml). This viral RNA profile correlated with the profiles of p24 and RT activity in the plasma of the 4 infected mandrills, as well as with virus isolation assays. We did not observe any significant post-infection changes in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell numbers or percentages, in peripheral blood; only a transient decrease of CD4<sup>+</sup> cells was recorded in LN. At days 360 p.i., CD4<sup>+</sup> values were not different from those observed before the infection and no increase in CD8<sup>+</sup> cells was observed. In conclusion, this rapid and extensive replication of SIVmnd-1 *in vivo*, reveal the adaptation of a SIV derived from a *Cercopithecus* monkey in mandrills. Despite this high level of viral replication, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell numbers remained stable raising questions regarding the susceptibility of mandrill T cells to immune activation and/or cell death in response to SIVmnd-1 infection *in vivo*.

## Introduction

African non-human primates are natural hosts for simian immunodeficiency viruses (SIV). To date, we know at least 18 distinct SIVs which naturally infect different simian species [Hahn et al., 2000]. These viruses were genetically characterized and shown to cluster in 6 major, approximately equidistant lineages [Sharp et al., 1999; Courgnaud et al., 2001]. Human viruses HIV-1 and HIV-2 belong to two of these clusters, and emerged most likely following zoonotical transmissions of respectively SIVcpz from chimpanzees and SIVsm from sooty mangabeys [Gao et al., 1999; Corbet et al. 2000; Chen et al., 1997]. Remaining clusters are formed by SIVs isolated from the four African green monkey species (third cluster); from syke's monkeys (fourth cluster) l'hoesti monkey, sun-tailed monkey and mandrills (fifth cluster) and from colobus (sixth cluster) [Müller et al, 1993; Emau et al., 1991; Hirsch et al., 1993; Tsujimoto et al., 1989; Beer et al., 1999; 2000; Courgnaud et al., 2001]. The phylogeny of many SIVs resembles that of their host species, suggesting a co-evolution [Allan et al., Jin et al., Gao et al.]. In contrast to these, some viruses (SIVrcm, SIVagm.sab) cluster in two distinct lineages according to the genomic region analyzed [Jin et al., 1994; Georges-Courbot et al., 1998]. These viruses most likely result from recombination events in monkeys dually infected by SIVs of two distinct lineages [Jin et al., 1994; Hirsch et al.]. Such dual infection suppose the existence of cross-species transmission of SIV *in natura*. It has indeed been shown that SIVagm can be transmitted to patas and baboons [Bibollet et al., 1996; van Rensburg et al., 1998]. It is unclear until now if these two late species are carriers of species-specific SIVs. This was also questioned for mandrills (*Mandrillus sphinx*). The first SIVmnd (GB1) was isolated 13 years ago from a wild-born mandrill [Tsujimoto et al., 1989]. This virus was for a long time the only representative of the SIVmnd lineage. More recently, two Cercopithecinae viruses (from l'hoesti and sun-tailed monkeys) were shown to cluster in the same lineage as SIVmnd GB1 [Hirsch et al., 1998; Beer et al., 1999]. As the genome of SIVmnd GB1 had the organization of *Cercopithecus* SIVs and not that of Papionini

SIVs, and because mandrills and solatus habitat overlaps in Gabon, it was suggested that SIVmnd GB1 represent a virus cross-transmitted from suntuiled monkeys to mandrills, and the lineage was christianized "I'hoesti lineage" [Hirsch et al., 1999; Beer et al., 1999]. It was recently demonstrated however, that SIVmnd GB1-related viruses (grouped together in the SIVmnd type 1) are largely present within wild adult mandrills, suggesting that the cross-species transmission occurred in the past and that the virus is capable today to efficiently spread between animals of this species [Souquière et al., 2001]. Interestingly, a second SIV (SIVmnd type 2) is spreading within wild mandrills. This latter virus has a genomic organization distinct from SIVmnd GB1 and SIVIhoest. Indeed, it has the same genes as SIVs from other papio monkeys, such as SIVsm [Souquière et al., 2001]. SIVmnd-2 is a complex recombinant virus, displaying an *env* structure close to the SIVmnd-1 GB1 virus, whereas the rest of the genome cluster together with other viruses isolated from members of the Cercopithecinae tribe, namely the SIVrcm, isolated from the red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) [Georges-Courbot et al., 1998] and SIVdrl isolated from drills (*Mandrillus leucophaeus*) [Cleweley et al., 1998]. The closer phylogenetic and genomic relationship of SIVmnd-2 to SIVs from other papio monkeys, in contrast to SIVmnd-1, might indicate that SIVmnd-2 has been present in mandrills for a longer time than SIVmnd-1.

Both SIVmnd-1 and SIVmnd-2 infections in mandrills have not been associated with signs of AIDS. One of the most striking features of lentiviruses naturally infecting non-human primates is indeed that, although all called simian immunodeficiency virus because of their genetic and structural similarities to the human AIDS viruses, these simian counterparts of HIV have not been observed to cause disease in their natural hosts [Fultz et al., 1990; Rey-Cuille et al., 1998; Diop et al., 2000; Goldstein et al., 2000; Corbet et al., 2000; Hirsch et al., 1999; Beer et al., 2000]. However, the same primate lentiviruses have a variety of outcomes after passage to heterologous host, most dramatic of which being the immunosuppression [Hirsch et al., 1995;

Baskin et al., 1988; Chalifoux et al., 1987; McClure et al., 1989; Simon et al., 1994]. Thus, the infection by SIVsm [Baskin et al., 1988; Chalifoux et al., 1987; McClure et al., 1989; Simon et al., 1994], SIVagm [Hirsch et al., 1995] or SIVlhoest [Hirsch et al., 1999] appears to induce AIDS in macaques, while resulting in asymptomatic infection in their natural host. Humans represents another example of increased virulence of lentiviruses following cross-species transmission. Thus, although both SIVcpz and SIVsm, the non-primate viruses which are considered to be at the origin of human AIDS, are non-pathogenic in their natural hosts [Rey-Cuille et al., 1998], the outcome of both HIV-1 and HIV-2 infection is associated with disease in humans.

It is unknown why SIV infections are non-pathogenic in African non-human primates. Comparative studies of the different outcomes of infections by these viruses in their natural hosts and in disease-susceptible hosts should offer the most valuable data for understanding which virus-host interactions are different in the natural and the heterologous host. However, most studies were focused on pathogenic models. In both HIV-1-infected humans and SIVmac-infected macaques it was shown that early virus-host interactions are predictive for the outcome of infection. Predictive markers are in particular T helper responses against p24 and viral load levels in the post-acute phase of infection [Mellors et al., 1996; Rosenberg et al., 1998]. In macaques, the steady-state levels of plasma viremia five to six weeks after exposure to the virus are an excellent predictor of the subsequent disease course [Hirsch et al., 1996; Watson et al., 1997; Lifson et al., 1997; Nowak et al., 1997]. In humans, high levels of plasma viremia at 6 months after primary infection are associated with a significantly increased relative risk for more rapid disease progression [Mellors et al., 1996, 1995, O'Brien et al., 1996]. However, although this observation is broadly acknowledged and used as the main indication for treating HIV-1-infected patients early in the course of the disease [Carpenter, 2000], little is still known about the driving mechanism (s) directing this phenomenon.

In the only model for non-pathogenic infection in the natural host studied so far during the primary infection (SIV<sub>agm.sab92018</sub> infection in AGMs), an extensive replication was observed in the acute and post-acute phase [Diop et al., 2000]. Naturally infected AGMs analyzed during the chronic phase also show continuous high viral RNA levels in plasma [Broussard et al., 2001]. Moreover, during the chronic infection of mangabeys with SIV<sub>sm</sub>, a continuous and high viral burden in blood and lymph nodes, of equivalent levels as that in macaques and humans progressing to AIDS, was reported despite the lack of development of clinical symptoms [Rey-Cuillé et al., 1998]. The absence of AIDS in these monkeys therefore seems to be paradoxical in the presence of such a high viral load. However, it is not clear whether the high viral replication observed is a general feature for non-pathogenic infections in natural host species. Thus, by analyzing viral RNA load in many chronically infected AGMs, the viremia levels during the chronic infection appeared highly variable between different animals [Goldstein et al., 2000]. In addition, primary infection was so far only studied in one model (AGMs infected with SIV<sub>agm.sab92018</sub>).

Our primary objective for the present study was to investigate the primary infection and the post-acute phase of SIV<sub>mnd-1</sub> infection in mandrills. We analyzed in particular the viral dynamics. SIV<sub>mnd-1</sub> is thought to represent the result of an ancient cross-species transmission in the wild [Beer et al., 1999; 2000b] and might represent an intermediate model between the pathogenic and non-pathogenic models of lentiviral infections. We therefore also corroborated the virological study with the analyses CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell changes over time in blood and LN. The investigation of host and viral parameters early in this infection contributes to better understand the establishment of the viral-host balance associated to non-evolution towards AIDS.

## **Materials and Methods**

**Animals.** All mandrills used in this study originated from a semifree range colony at the International Center of Medical Research in Franceville (CIRMF), in Gabon. The source mandrill (GB1) was a wild-captured female (F17) introduced into colony when juvenile in 1985. F17 was seropositive for SIVmnd-1 at time of capture and seronegative for simian T-cell leukemia virus (STLV). The prototype SIVmnd-1 strain (GB1) was isolated from this mandrill in 1988 [Tsujiimoto et al., 1988; Tsujiimoto et al., 1989]. The other monkeys included in our study (16E, 12C2, 2C2, 12A4 10G, 5H and 2I) were males (16E, 12C2, 2C2 and 12A4) or females (10G, 5H and 2I), born in the semifree colony. SIV and STLV seronegativity prior to inoculation were demonstrated by western blotting (New Lav Blot II Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette, France; and HTLV Blot 2.3, Genelabs Diagnostic). All these animals were young adults aged between 8 and 9 years old at the time when the protocol begun, with an average mean weight of 14.3 Kg for males and 7.7 Kg for females.

**Virus and infections.** To avoid *in vitro* culture selection of viral variants, all inocula used in this study consisted of plasma obtained from SIVmnd-1-infected mandrills. SIVmnd-1 virus was first obtained from its original host (F17) still living and symptom free. Ten ml of blood was collected, plasma was separated by centrifugation, aliquoted and frozen at -80°C. The plasma was then titrated on Sup T1 cells. Briefly, serial tenfold dilutions of the plasma were added to  $0.5 \times 10^6$  SupT1 cells (four wells per dilution). Virus production was measured by detection of RT activity (Cavidi Tech, Uppsala, Sweden) in the supernatant of each well at days 14 and 28 of culture. The infectious titer of the plasma was then expressed as the 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) determined by the Karber calculation method. The plasma of chronically infected F17 had a titer of 4 TCID<sub>50</sub>/ml. In order to obtain a plasma with a higher titer, mandrill 16E was inoculated with 5 ml of plasma (20 TCID<sub>50</sub>) from F17. Twenty-five ml of blood were collected from 16E at day 11 p.i.. One ml aliquots of plasma samples were prepared and frozen at -70°C. The infectious titer of the plasma from 16E on SupT1 cells, determined by the limiting-dilution

assay described above, was 3,000 TCID<sub>50</sub>/ml.

For each intervention, animals were ketamine-HCl anesthetized. Four mandrills (12A4; 10G; 12C2; 2C2) were inoculated with 300 TCID<sub>50</sub> of the plasma from 16E. Two other mandrills (5H and 2I) were used as negative controls. They received the same amount of plasma (100 µl) from mandrill 16E sampled prior to SIVmnd GB1 inoculation.

**Specimen collection.** Seven to ten ml of whole blood were collected from every monkey in EDTA-K2 tubes, before the infection (at days -30 and -15), then twice weekly throughout the first 3 weeks p.i. (days 0, 4, 7, 10, 14, 17 and 21) and finally at days 28, 32, 60, 180, and 360. PBMC were isolated by Ficoll-Hypaque gradient. PBMC were frozen in DMSO and plasma aliquots were stored at -70°C and used to quantify viral load. Excisional axillar and inguinal LN biopsies were collected before the infection at days -30 and -15, during primary infection at days 0, 7, 10, 14, 17, and 28 and during chronic infection at days 60, 180 and 360 p.i. After excision, the lymph nodes were dilacerated. Cells were separated from the remaining tissue by passage through a 100-mm nylon mesh, resuspended in RPMI, centrifuged 10 min at 1700 rpm and frozen in DMSO at -80°C until used.

**Antibody detection.** Antibody responses to SIVmnd-1 GB1 were monitored by an HIV-1/HIV-2 ELISA (Genelavia Mixt, Sanofi-Diagnostics Pasteur) and confirmed by a SIV specific EIA (PIV-EIA) designed to detect both antibodies toward the immunodominant region of the gp36 and highly variable region of the V3 loop [Simon et al., 2001]. Reactivity was also confirmed by Western blotting (New Lav Blot, Sanofi Diagnostics Pasteur).

**Virus isolation.** Virus was isolated from plasma at days 11 and 60 p.i. by cocultivation of 2x10<sup>6</sup> SupT1 cells with 1 ml mandrill plasma. The volume was then adjusted with medium to 10<sup>6</sup> cells/ml. The cultures were monitored for 28 days, with growth medium being replaced every 3 to 4 days, and the culture fluid was stored at -80°C until analysis for virus by measurement of the RT activity (Càvidi, Uppsala, Sweden) in supernatants.

**Quantification of viral antigen in the plasma by measurement of P24 and Reverse-Transcriptase (RT) Activity.** Plasma samples were assayed for p24 antigen by using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Gag p24 (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette, France) with standards provided in the kit according to the manufacturer's instructions. This ELISA kit was initially designed to detect p24 of HIV-1, but it was reported to detect also *gag* antigens of SIVmnd-1 [Souquière et al., 2001]. In addition, we confirmed its cross-reactivity for SIVmnd-1 *gag* antigens by testing culture supernatants of cells infected by SIVmnd-1 as well as plasma samples from acutely infected mandrills. Supernatants from uninfected cells and plasma from uninfected mandrills were used as negative controls (data not shown).

The RT Activity was evaluated with the Lenti-RT™ kit (Cavidi Tech, Uppsala, Sweden) according to manufacturers' instructions. Two hundreds µl of plasma were centrifuged at 100,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The liquid phase was eliminated and the viral pellet was lysed with 20 µl lysis buffer to release the RT. Ten microliters of viral lysate were added to 96 microwells plates coated with poly-rA which serves as template for the RT and incubated for three hours at 33°C on an orbital shaker. After seven washes, 100 µl of oligo-dT which serves as primer was added and plates were incubated for 90 min. at 33°C on an orbital shaker. Plates were then washed seven times and 125 µl of the substrate, a specific monoclonal anti-BrdU antibody, conjugated to alkaline phosphatase was added. Plates were incubated for 30 min, 2 hours and overnight and reaction was than read at 405 nm. The assay has been optimized for lentiviral RT that depend on Mg<sup>2+</sup>. The use of a test standard allowed a quantitative measurement of the RT activity. The limit of detection of the assay is 0.01 pg of RT.

**Quantification of plasma viral RNA.** RNA was extracted from plasma using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturers instructions. We developed a highly sensitive limiting-dilution RT-PCR assay to evaluate SIVmnd-1 RNA.



The primers utilized were: MP5 (5'-CCA GAT AAG TGG AAG ATA GAA AAG-3') and MP6 (5'-GGG AGA TAT GGG AAG ATT GGG-3'), allowing the amplification of a 476-bp region within the SIVmnd-1 *pol* gene as previously described [Nerrienet et al., 1998]. One should note that the isolate used in this study derived from the GB1 strain sampled from its original host. The possibility of the existence of mismatches is therefore minimal.

Starting from x RNA, seven 10-fold serial dilutions were subjected to RT-PCR (one step RT-PCR kit, Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription was performed at 50°C for 30 min in the presence of MP5 and MP6, followed by 47 cycles of 95°C for 15s, 55°C for 45s and 72°C for 1 min, with a final extension of 7 min at 72°C. The absolute target copy numbers were determined by the amplification of known amounts of a SIVmnd-1 RNA external standard. The standard was obtained by amplifying the 476-bp region of SIVmnd-1 *pol* from DNA isolated from mandrill 17 using primers MP5 and MP6. The *pol* PCR product was then cloned into the pCR 2.1 vector using the topoTA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). The 5'-3' sense orientation of the insert was verified by sequence analyses. A clone containing the insert in 5'-3' orientation was chosen and subjected to PCR using the primer pair pCRT7S 5' (GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG GA GCTC GAG CGG CCG CCA GTG TG) and pCRT7AS (5'-ATT ACG CCA AGC TTG GTA CCG AG-3') which hybridize to regions just upstream and downstream of the pCR2.1 plasmid polylinker sequence. Cycling conditions for this PCR consisted of: initial DNA denaturation was followed by 40 cycling steps that included a denaturation step at 92°C for 30 seconds, primer annealing at 62°C for 45 seconds and DNA synthesis at 72°C for 45 seconds with a final extension of 7 min at 72°C. The resulting PCR product contained the cloned insert together with a T7 promoter sequence at its 5' end. After clean-up of the PCR product (PCR purification kit Qiagen, Courtaboeuf, France), this DNA was used as a template for an *in vitro* transcription (MEGAscript kit, Ambion, Austin, TX). The resulting RNA was DNase digested and non-incorporated nucleotides were eliminated using a

Chroma Spin-30 DEPC H<sub>2</sub>O Column (Clontech, Palo Alto, CA). Size and purity of the synthesized RNA were verified on a denaturing-PAGE gel. The concentration of the *in vitro* transcript was determined by a highly sensitive and specific Gene Quant II spectrophotometric operation system as already described [Diop et al., 2000]. Aliquots were stored at -80°C until use. Immediately before usage, one aliquot of RNA was thawed, diluted in RNase free H<sub>2</sub>O and five dilutions of the RNA were used as external standard in each experiment.

As a control to determine whether the sensitivity of the RT-PCR could be affected by the presence of putative, naturally occurring inhibitory molecules in plasma, we mixed individual plasma samples, obtained before infection of animals, with SIVmnd standard RNA, extracted the RNA as usual, and subjected the extracts to limiting dilution RT-PCR. No changes in the sensitivity of the RT-PCRs were observed when the standard RNA was previously mixed with plasma in comparison to standard RNA alone (data not shown). The sensitivity of the assay is  $2.10^2$  RNA copies/ml of plasma.

**Flow cytometry analysis of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in blood and LNs.** CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocyte subsets from mandrills were analyzed by flow cytometry. PBMC ( $2 \times 10^5$  cells) separated from whole blood and the same number of lymphocytes separated from the lymph nodes were stained with 5  $\mu$ l of the appropriate monoclonal antibody (anti-CD4 Leu<sup>TM</sup>-3a, anti-CD8 Leu<sup>TM</sup>-2a, Becton Dickinson, Mountain View, CA) and relevant negative controls IgG1 FITC (PN0639-Immunotech) and IgG2a PE, IgG1 PE (Becton Dickinson). Cells were incubated within the antibody for 20 minutes at 4°C. This was followed by a lysis step of 5 min using an "in house" prepared lysing solution containing NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>H 0,9mM and NH<sub>4</sub>Cl 131 mM, in order to eliminate the erythrocytes. Cells were then washed two times in PBS and finally fixed with 1% paraformaldehyde (PFA). Samples were analyzed on a FACScalibur flow cytometer with Cell Quest software (Becton Dickinson). Absolute counts were determined by multiplying the percentage for each absolute subset (%CD4, %CD8 or %

CD4/CD8) and the absolute (total) lymphocyte count obtained from clinical haematology data on the same samples. Relative changes in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocyte subsets were calculated after dividing the absolute count at each time-point by the average of two pre-infection cell counts (Day -30 and Day-15).

**Statistical analysis.**

## Results

Early events during lentivirus infection in primates are considered to reflect the capacity of host factors to control infection. Little is known however on the early virological and immunological events associated with nonpathogenic SIV infection in their natural carriers. We have studied virus and T cells kinetics during acute and postacute phases of infection in four mandrills experimentally infected with SIVmnd-1.

**Absence of primary infection syndrome in mandrills experimentally infected by SIVmnd-1.** The animals were followed up to day 360 p.i. None of the animals had fever. No loss of weight was observed during the follow-up in infected animals. No increase in size of lymph nodes nor opportunistic infection were recorded. One mandrill (12C2) died at day 200 p.i. Autopsy did not revealed signs of visceral infection associated with AIDS. The unique possible fatal event was a gastric dilatation wich is frequently reported in literature to be the cause of the death in captive monkeys [Wallach, 1979]. Transient variations in the percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells were observed in mandrill 2C2 (see below), but the absolute numbers of these lymphocyte subsets remained within the normal range during the follow up (320 to 1,210 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> cells/ $\mu$ l and 820 to 3125 CD8<sup>+</sup> cells/ $\mu$ l, respectively).

**SIVmnd-1 infected mandrills rapidly develop antibodies directed against viral proteins.**

By commercial ELISA screening assay (HIV-1/HIV-2, Genelavia, SDP, France) all animals

inoculated with SIVmnd-1 showed detectable anti-gp36 antibodies starting from days 28 and 32 and maintained a sustained antibody response (Figure 1a). Similar patterns of reactivity (appearance of anti-p26 at day 28 p.i. and appearance of anti-gp105 by day 32 p.i.) were also observed by using the HIV-2 Western blot antibody detection (data not shown). In order to test reactivity specifically directed against SIVmnd antigens, we used the PIV-EIA. The strongest reactivities were directed toward the SIVmnd peptides in comparison to peptides of other SIVs and HIVs (data not shown). Anti-gp36 antibodies were detected at days 28 to 32 (Figure 1b) while anti-V3 antibodies were detected starting from day 32 (Figure 1c). This difference is not surprising, as it was already shown that V3 reactivity always appears later than gp41/36 reactivity [Simon et al., 2001]. The antibody detection was more efficient in both peptide test than in the commercial HIV-1/HIV-2 ELISA which map the gp41/36 immunodominant regions. Thus, PIV-ELISA gave both stronger and earlier reactivity. The commercial ELISA test (Genelavia) uses an anti- $\mu$  conjugate enabling also the detection of IgMs, in contrast to the PIV-EIA which detects only IgG. However, Genelavia contains only HIV-1/HIV-2 antigens, whereas the PIV-EIA includes SIVmnd-1 specific peptides which probably explains its better performance. In conclusion, the serological data showed that in mandrills infected by SIVmnd-1 (GB-1) anti-SIV antibodies were detected as early as in macaques infected by SIVmac [Staprans et al., 1999].

**Extensive viremia during the acute phase of SIVmnd-1 infection.** In order to study the extent of early virus growth during the SIVmnd-1 infection of mandrills, we investigated the dynamics of plasma viremia. By day 7 p.i., all infected animals had detectable levels of p24 antigen in plasma (Figure 2a). The peak of plasma antigenemia was already reached by day 7 in two animals (12A4 and 10G) and at day 10 for the other two (12C2 and 2C2). The amount at the peak varied up to fourfold (10 to 47 pg/ml) among animals that had received identical inocula (Figure 2a). Antigenemia then declined to undetectable levels that were reached

between days 17 and 21 p.i., before the detection of specific anti-SIVmnd antibodies (Figure 1). However, higher viral loads have not been correlated with stronger antibody titers in experimentally infected animals. Antigen amounts detected here were lower than those described during SIVagm infection in AGMs [Diop et al., 2000]. The low levels of antigen detected during the primary SIVmnd-1 infection might be due to a low viral load or rather to a lower sensitivity of the HIV-1 p24 core antigen assay for SIVmnd-1 and thus to an underestimation of the the antigenemia levels.

We therefore measured SIVmnd-1 antigen in the plasma using an RT-assay that is equally specific for all lentiviruses. The kinetics of reverse-transcriptase activity in plasma were consistent with p24 Ag profiles (Figure 2b). By day 7 p.i., all infected animals had quantifiable levels of RT antigen and the peak values were reached by day 7 (12A4) or day 10 (10G; 12C2; 2C2) (Figure 2b). The extent of this early RT activity in plasma varied up to threefold among infected animals (36 to 98 pg/mL). They declined then to undetectable levels between days 21 and 28 p.i. (Figure 2b). In conclusion, the measurement of plasma RT activity confirmed the early peak of viral replication between day 7 and day10.

For other pathogenic or non-pathogenic infection models there are however no data available for RT activity in plasma. To compare SIVmnd-1 replication dynamics to that of pathogenic SIVmac in macaques and non-pathogenic SIVagm in African green monkeys, we developed a SIVmnd-1 specific quantitative RT-PCR assay. RNA levels in the plasmas were evaluated in all mandrills during the acute and postacute phases of SIVmnd infection (Figure 2c). A peak of plasma viral RNA was observed again very early at days 7 or 10 and ranged from  $4.5 \times 10^6$  to  $1.5 \times 10^8$  copies per ml of plasma. Those animals that showed the highest RNA values were not necessarily those with the highest antigenemia (Figure 2a and b). As it was the case with antigenemia, viral RNA in plasma then declined rapidly; a decline of 10- to 1,000-fold was observed for all animals between days 10 and 21, followed by a further 10 fold

decline in one out of 4 mandrills (12A4) before day 60 (Figure 2c). For three animals, the time point at which viral load stabilized (viral set point) was already reached between days 21 and 28. Between days 35 and 360, no significant variations in plasma viral RNA loads were noted, except for 12A4, which showed a further 1 log decrease between D30 and D60. Plasma viral loads remained at  $2 \times 10^5$  RNA copies/ml in post-acute phase at day 180 p.i. and then presented slight variations until day 360 p.i (Figure 2c). The range of these variations was of 0.6 log between the different animals, but less than 0.5 log within the same monkey (Figure 2c). The naturally chronically infected mandrill which served as a donor animal (F17), had an RNA plasma viral load in a similar range ( $5 \times 10^5$  copies per ml of plasma) at the time of sampling, suggesting that the experimentally induced infections reproduced the features of natural infection.

In order to study whether Ag and RNA profiles reflect levels of infectious virus, we performed virus isolation close to the peak (day 11) and after the viral set point (day 60 in all four animals). Virus could always be isolated more readily using plasma collected at day 11 than at day 60 (Figure 3).

**Moderate quantitative changes of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell lymphocytes despite high level replication.** Our data reveal very high levels of SIVmnd-1 replication during the primary infection which, after a rapid decrease, stabilise at still relatively high levels. This contrasts with the presumed non-pathogenic outcome of the infection. In order to confirm the absence of biological signs for progression, we evaluated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell numbers over time. In addition, we addressed the question whether the viral replication profiles are associated with cell target numbers and/or if rapid decrease of viral load correlates or not with increase in CD8<sup>+</sup> cells. We therefore evaluated the quantitative changes of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the blood at the same time points as those analyzed for viral load.

We performed analysis of three time points for each animal before inoculation in order to

determine mean values of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> for each individual and to assess intra-individual variations. Before infection, the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> values in the blood of the 4 animals ranged from 506 cells/ $\mu$ l to 952 cells/ $\mu$ l. The intra-individual variability was of ... $\pm$ ..... for CD4<sup>+</sup> cells and of ... $\pm$ ..... for CD8<sup>+</sup> cells (Figure 4a, b). One of the two mandrills included in the control group (5H) had similar mean values 774 $\pm$ 240 CD4<sup>+</sup> cells/ $\mu$ l and 1868 $\pm$ 473 CD8<sup>+</sup> cells/ $\mu$ l. The other control mandrill (2I), although of same age than others, displayed higher CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> values of normal blood counts values for mandrills. This higher CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> counts of 2I were constantly recorded during the follow-up, the mean CD4<sup>+</sup> levels being 1602 $\pm$ 310 cells/ $\mu$ l whereas the mean CD8<sup>+</sup> counts were 3210 $\pm$ 596 cells/ $\mu$ l.

These CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell counts observed in mandrills were different from those observed in humans (1450 $\pm$ 450 CD4<sup>+</sup> cells/ml and 560 $\pm$ 230 CD8<sup>+</sup> cells/ml) and macaques (1150 $\pm$ 500 CD4<sup>+</sup> cells/ml and 1400 $\pm$ 600 CD8<sup>+</sup> cells/ml), but were similar to those recorded for AGMs (200-3000 CD4<sup>+</sup> cells/ml and 500-4300 CD8<sup>+</sup> cells/ml). The same is true for CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio in mandrills, which is more close to that observed in AGMs than to humans or in macaques [].

During the primary infection with SIVmnd-1, blood CD4<sup>+</sup> counts in the study group presented a transitory slight decrease between days 7 to 10 p.i. in three mandrills (12A4, 10G and 12C2), and at day 21 p.i. in mandrill 2C2. This slight decrease was paralelised by a slight increase in CD8<sup>+</sup> counts in tow animals (12A4, 12C2). Neither CD4<sup>+</sup> cells decrease nor CD8<sup>+</sup> increase were not statistically significative. Moreover, a slight increase in CD8<sup>+</sup> cells was also recorded for an animal in the control group (5H).

When immune cell dynamic was evaluated using proportion of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells (%), a slight decrease in CD4<sup>+</sup> counts was also observed during days 7-21 p.i. Once again, this decrease was not statyistically significant. The reduction in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio of about 6% compared with the mean values recorded prior to the inoculation. During the acute phase of infection, the minimum

values of the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratios were recorded at day 14. This reduction of the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratios was variable between the infected animals and was also observed in one control mandrill. The mechanisms of the reduction in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio were different between the different infected mandrills; thus, in 10G and 2C2 the lower ratio was due to an decrease in CD4<sup>+</sup> counts, whereas in 12A4 and 12C2, the lower ratio was due to an increase in CD8<sup>+</sup> counts (Figures 4, 5).

During the post-acute chronic phase of infection, the lowest value of the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio was recorded at day 60 p.i., then, during the follow up, the CD4<sup>+</sup> counts presented constant evolution, reaching by day 360 similar levels as before the inoculation (Figure 3a). Similar results were observed by analyzing CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio (Figure 4). CD8<sup>+</sup> counts reached normal values in both control and study group animals. Similar profiles of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> dynamic were observed in the control group. Immunophenotypic results at day 360 p.i. have shown similar results than those observed prior to the inoculation. There were no reductions in CD4<sup>+</sup> counts nor increasing in CD8<sup>+</sup> counts. These results were confirmed by both percentage and absolute value. CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratios were similar in the two groups of animals at the same values as those recorded prior to the inoculation. Subsequent measurements performed during the chronic phase of infection will confirm this tendency observed at day 365.

Alltogether these results shows that both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell dynamics were close to the values recorded before the virus challenge and no significant differences were observed between the infected animals and those from the control group. Thus, the pattern of dynamics seems rather correlated with the administration of heterologous plasma and regular sampling of small volumes of blood than to the active replication of the virus. This strongly suggests the lack of progression in infected animals during the follow-up.

In the lymph nodes, a significant? ( $p <$ ) reduction in CD4 counts was recorded in three animals (12A4, 12C2, 10G) during acute phase of the primo-infection. The reduction of CD4<sup>+</sup> counts in



the lymph nodes was paralleled by an increase in CD8<sup>+</sup> counts in two mandrills (12C2 and 2C2). Reduction in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio of up to 0.3 were observed at day 21 in the study group (Figure 6). These reduced CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratios were due to dropping in CD4<sup>+</sup> counts of about 10% (from 35% to 25%) (Figure 3d and Figure 6). This reduction was compensated during the follow-up, so, by day 360 CD4<sup>+</sup> counts reached similar levels with those observed prior to inoculation. Interestingly, CD8<sup>+</sup> counts in lymph nodes were remarkably stable during the follow up. During the chronic phase of the SIVmnd-1 infection, the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> percentages were identical between the animals in the two groups.

## Discussion

Here we describe the virus and host parameters during non-pathogenic infection of mandrills with SIVmnd-1. Our study shows that viral replication is high in mandrills. The viral RNA levels in plasma were similar to those encountered during the primary and chronic infection of pathogenic viruses in human and non-human primates [Diop et al., 2000, Broussard et al., 2001, Rey-Cuille et al., 1998, Staprás et al., 1997, Watson et al., 1997]. The amount of core antigen detected by the HIV-1 p24 Ag assay was lower than p27 levels reported in macaques infected by pathogenic SIVmac [Chakrabarti et al., 1995; Reimann et al., 1994; Wykrzykowska et al., 1998]. This might however be related to a low affinity for SIVmnd-1 core Ag of the polyclonal antibodies present in the commercial HIV-1 and SIVmac assays. Indeed, high viremia was also suggested by detection of RT activity in plasma, easy virus isolation in all the mandrills and high infectious titer of plasma from the donor mandrill. The peak of SIVmnd-1 replication, observed around day 10, was constantly followed by a rapid and significant decrease of viral load (the drop of viral load was of 10-1000 fold in the post-acute phase between days 10 and 21) (Figure 2). The profiles of SIVmnd-1 replication in mandrills, as measured by copy numbers of genomic RNA and RT or p24 antigenemia, were very similar to each other despite the inherent variability

in the test's sensitivities. Finally, the viral dynamics profiles and levels were also remarkably similar between distinct individuals, either the mandrills included in our study group or the previously described AGMs [Diop et al., 2000].

During the post-acute and chronic phase of infection (studied here between days 35 and 360 p.i.) viral loads levels remained considerable. They were constant within a same monkey, although variable between different tested animals.

This high replication of SIVmnd-1 during the primary infection and in the post-acute phase of the chronic infection contrasts with the results obtained in pathogenic lentiviral infections. Thus, for HIV-1 and SIVmac infections, levels of  $10^5$ - $10^7$  were associated with a high risk of progression [Van taft, Staprans et al., 1997, Mellors et al., 1996]. So, the absence of SIVmnd-1 pathology in mandrills seems to be paradoxical in the presence of such a high viral load. Similar or even higher plasma load levels are also very well tolerated in AGMs and mangabeys naturally infected by respectively SIVagm and SIVsm [Diop et al., 2000, Broussard et al., 2001, Goldstein et al., 2000, Rey-Couillé et al., 1998]. This study confirms that African monkeys are in a nonpathogenic equilibrium with their corresponding virus and that the high levels of replication observed during the HIV infection are not the only factor accounting for the progressive CD4<sup>+</sup> T cell-depletion and AIDS. Our results which shows that viral replication in mandrills is similar to that observed in sooty mangabeys [Rey Cuille et al., 1998] and AGMs [Goldstein et al., 2000; Broussard et al., 2001] strongly suggests that similar mechanisms are involved in the protection against disease progression in distinct African non-human primate species.

Our study present for the first time the dynamics of CD4<sup>+</sup> counts during the primary infection in non-pathogenic infection in African monkeys. Although we did not observed an important drop in CD4<sup>+</sup> counts during the acute stage of infection, as observed in macaques and humans, a slight reduction in CD4<sup>+</sup> associated with the peak of viral replication cannot be totally excluded. This reduction might be due to either viral-induced apoptosis or cell sequestration in the lymph

nodes or by emergence of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) as suggested for HIV [Koup et al., 1994; Koup et al., 1994; Musey et al., 1997; Phillips, 1996; Safrit & Koup, 1995; Zaitseva et al., 1997]. However, in lymph nodes, CD4<sup>+</sup> percentages present a drop after the peak of viral replication generating changes in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio even more important than those observed in peripheral blood. These data suggests a direct involvement of viral replication on immune system effectors.

The CD4<sup>+</sup> decrease was however transient and only moderate. Additional analyses should be performed to investigate if the tendency of a decline in CD4<sup>+</sup> peripheral cells will be observed in chronically infected mandrills. In both AGMs and mangabey infected by SIVagm and SIVsm respectively, a slight decline in peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell counts below those for uninfected animals was also described [Beer et al., 1998; Chakrabarti et al., 2000b]. However, these moderate decreases do not seem to compromise the clinical status of the animals [Broussard et al., 2001].

This dynamics of CD4<sup>+</sup> cells alone do not explain changes in viral burden. However, the activation state of these cells might contribute to the control of viral replication in African monkeys. Viral control seems not be associated with particular strong immune responses. Indeed, we did not observe in the mandrills signs of fever or of hyperplasia of peripheral lymph nodes that could be markers for a strong immune activation. In addition, the viral replication is not suppressed after the set point, but rather goes on at considerable high levels. The SIVmnd-1 dynamics in the blood might be related to the numbers of available target cells in the mandrills. Both CD4<sup>+</sup> counts and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio returned to normal values by day 60 p.i. which shows that during the apathogenic primary lentiviral infection in non-human primates the virus-host equilibrium are rapidly reached. These data are also confirmed by viral load data showing that the viral set point is already reached by day 60 p.i.

In pathogenic lentiviral infections, a rapid turnover of both virus and activated CD4<sup>+</sup> T cells

maintains high levels of HIV and SIVmac in the blood [Ho et al., 1995; Perelson et al., 1996; Wei et al., 1995; Hellerstein et al., 1999; Mohri et al., 1998; Rosenzweig et al., 1998]. These data led to the formulation of the dynamic model of AIDS pathogenesis whose central assumption is that active HIV replication induces an accelerated rate of CD4<sup>+</sup> cells destruction [Ho et al., 1995; Perelson et al., 1996] leading to the overwhelming of lymphocyte reserves and the collapse of the immune system. Direct cell destruction might be accompanied by other deleterious effects such as a propensity of uninfected lymphocytes to undergo apoptosis, destruction of the lymphoid tissue architecture and suppression of bone marrow and thymic production of precursors cells [Finkel et al., 1995; Gougeon et al., 1996; Haase, 1999; Estaquier et al., 1994]. However, this "open tap-open drain" model of HIV pathogenesis is not completely fulfilled by non-pathogenic SIV infections in African monkeys. The analyses of the target peripheral cell dynamics showed that there is no significant decrease of the CD4<sup>+</sup> cells, nor increase of the CD8<sup>+</sup> cells in mandrills infected with SIVmnd-1 during the follow up despite equivalent levels of viral replication.

The absence of progressive increase of CD8<sup>+</sup> cells in the mandrills and the lack of fever or lymph node hyperplasia are in favor of this hypothesis. Our results are in agreement with previously reported data from other species African monkeys. In mangabeys, a species close to mandrills, a normal T-cell turnover despite harboring active SIVsm infection was reported [Chakrabarti et al., 2000]. Also, a relative resistance in the development of CD4<sup>+</sup> cell anergy was reported for this species [Bostik et al., 2001].

Altogether, our data confirm that the viral load alone is not responsible for the non pathogenic nature of lentiviral infections in African monkeys. Supplementary investigations which are currently in progress are needed to understand the mechanism underlying the particular virus-host equilibrium in these models. The most valuable hypothesis for explaining these features is that the susceptibility of mandrill cells to viral-driven activation might be different from those

observed in both humans and macaques.

Our data suggests that the SIVmnd-1 is well adapted to mandrills. This observation is in agreement with epidemiological studies showing that SIVmnd-1 efficiently spreads among wild mandrills [Souquière et al., 2001].

Cross-species transmission of lentiviruses can account for an increase pathogenicity in the newly infected host, such it was observed in both humans and macaques [Hahn et al., 2000; Baskin et al., 1988; Chalifoux et al., 1987; McClure et al., 1989; Simon et al., 1994]. However, other circumstances of cross-species transmission between African monkeys were not reported to associate any pathology related to AIDS. Thus, the SIVagm virus was transmitted to yellow and chacma baboons [Jin et al., 1995; Van Rensburg et al., 1998] and patas monkeys in the wild [Bibollet-Ruche et al., 1996] without inducing so far any sign of immunodeficiency. Conversely, the experimental infection of macaques with SIVagm virus succeeded in inducing AIDS similarly to the infection by SIVsm from sooty mangabeys or by SIVlhoest from l'hoesti monkeys [Hirsch et al., 1995; Hirsch et al., 1999]. Although mandrills are natural reservoir of SIVmnd-1, as shown by high prevalences of this virus in wild mandrills [Souquière et al., 2001] recent evidences suggests that SIVmnd-1 might be a cross-transmitted virus from monkeys belonging to l'hoesti supergroup toward mandrills. Our data showing no pathogenicity associated with primary SIVmnd-1 infection in mandrills corroborate epidemiological data which shows no pathogenical or clinical sign of immune suppression in SIVmnd-1 naturally infected mandrills. Altogether, these data suggests that either the virus has adapted to a non-pathogenic steady-state infection (the cross-transmission being ancient) or that the African monkeys are resistant to immune suppression and/or abnormal activation induced by primate lentiviruses. However, this virus host equilibrium reported for African monkeys it is not an absolute phenomenon but rather a delicate balance dependent of several factors one of which being represented by viral adaption: both HIV-1 and HIV-2 were shown to be pathogenic in

chimpanzees and baboons, respectively [Novembre, 2000; Bartlet et al., 1994]. After adaption in macaques, the SIVsm was shown to be pathogenic even in its natural host, the sooty mangabey [Fultz et al., 1989].

The pathogenesis of lentiviral infection in African monkeys should be thus investigated in order to establish the factors associated with either viral adaptation to the new host or to resistance to lentiviral infection. This study should also provide valuable explanations for understanding clinical circumstances observed in human patients infected by HIVs such as the immune reconstruction observed in some HAART non-responding patients or the maintaining of CD4<sup>+</sup> counts in long term non-progressors. Finally, understanding the factors which are responsible for the maintaining of the steady-state of infection in African primates are necessary to elaborate valuable and affordable strategies for the control of HIV/AIDS pandemic.

## References

- Ahmad, A., and J. Menezes. 1996. Defective killing activity against gp120/41-expressing human erythroleukaemic K562 cell line by monocytes and natural killer cells from HIV-infected individuals. *AIDS* 10: 143-149.
- Baskin, G. B., M. Murphey-Corb, E. A. Watson, and L. N. Martin. 1988. Necropsy findings in rhesus monkeys experimentally infected with cultured simian immunodeficiency virus (SIV/Delta). *Vet. Pathol.* 25: 456-467.
- Beer, B. E., E. Bailes, G. Dapolito, B. J. Campbell, R. M. Goeken, M. K. Axthelm, P. D. Markham, J. Bernard, D. Zagury, G. Franchini, P. M. Sharp, and V. M. Hirsch. 2000. Patterns of genomic sequence diversity among their simian immunodeficiency viruses suggest that L'Hoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*) are a natural lentivirus reservoir. *J. Virol.* 74: 3892-3898.
- Beer, B. E., E. Bailes, R. Goeken, G. Dapolito, C. Coulibaly, S. G. Norley, R. Kurth, J. P. Gautier, A. Gautier-Hion, D. Vallet, P. M. Sharp, V. M. Hirsch. 1999. Simian immunodeficiency virus (SIV) from sun-tailed monkeys (*Cercopithecus solatus*): evidence for host-dependent evolution of SIV within the *C. lhoesti* superspecies. *J. Virol.* 73: 7734-7744.
- Beer, B., J. Denner, C.R. Brown, S. Norley, J. zur Megede, C. Coulibaly, R. R. Plesker, S. Holzammer, M. Bayer, V.M. Hirsch, and R. Kurth. 1998. Simian immunodeficiency virus of African green monkeys is a pathogenic in the newborn natural host. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 18: 210-220.

- Beer, B.E., E. Bailes, P.M. Sharp, V.M. Hirsch. 2000b. Diversity and evolution of primate lentiviruses. In: *Kuiken, C., B. Foley, B. Hahn, P.A. Marx, F. McCutchan, J. Mellors, J. Mullins, S. Wolinsky, B. Korber (Eds): Human retroviruses and AIDS. 1999. A compilation and analyses of nucleic acid and amino acid sequences.* Los Alamos National Laboratory, Los Alamos N.M. pp: 460-474. <http://hiv-web.lanl.gov>.
- Bentwich, Z., A. Kalinkovich, and Z. Weisman. 1995. Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of African AIDS. *Immunol. Today* 16: 187-191.
- Bibollet-Ruche, F., A. Galat-Luong, G. Cuny, P. Sarni-Manchado, G. Galat, J. P. Durand, X. Pourrut, and F. Veas. 1996. Simian immunodeficiency virus infection in a patas monkey (*Erythrocebus patas*): evidence for cross-species transmission from African green monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaues*) in the wild. *J. Gen. Virol.* 77: 773-781.
- Blaak, H., A. B. van't Wout, M. Brouwer, M. Cornelissen, N. A. Kootstra, N. Albrecht-van Lent, R. P. M. Keet, J. Goudsmit, R. A. Coutinho, and H. Schuitemaker. 1998. Infectious cellular load in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and susceptibility of peripheral blood mononuclear cells from their exposed partners to non-syncytium-inducing HIV-1 as major determinants for HIV-1 transmission in homosexual couples. *J. Virol.* 72: 218-224.
- Blaxhult, A., F. Granath, K. Lidman, and J. Giesecke. 1990. The influence of age on the latency period to AIDS in people infected by HIV through blood transfusion. *AIDS* 4: 125-129.
- Broussard, S.R., S.I. Staprans, R. White, E.M. Whitehead, M.B. Feinberg, J.S. Allan. 2001. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J. Virol.* 75: 2262-2275.
- Brun-Vezinet, F., C. Boucher, C. Loveday, D. Descamps, V. Fauveau, J. Izopet, D. Jeffries, S. Kaye, C. Krzyanowski, A. Nunn, R. Schuurman, J.M. Seigneurin, C. Tamalet, R. Tedder, J. Weber, G.J. Weverling. 1997. HIV-1 viral load, phenotype, and resistance in a subset of drug-naive participants from the Delta trial. The National Virology Groups. Delta Virology Working Group and Coordinating Committee. *Lancet.* 350: 983-990.
- Carpenter, C.C., D.A. Cooper, M.A. Fischl, J.M. Gatell, B.G. Gazzard, S.M. Hammer, M.S. Hirsch, D.M. Jacobsen, D.A. Katzenstein, J.S. Montaner, D.D. Richman, M.S. Saag, M. Schechter, R.T. Schooley, M.A. Thompson, S. Vella, P.G. Yeni, and P.A. Volberding. 2000. Antiretroviral therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 283: 381-390.
- Chakrabarti, L.A., V. Baptiste, E. Khatissian, M.C. Cumont, A.M. Aubertin, L. Montagnier, and B. Hurtel. 1995. Limited viral spread and rapid immune response in lymph nodes of macaques inoculated with attenuated simian immunodeficiency virus. *Virology* 213: 535-548.
- Chakrabarti, L.A., S.R. Lewin, L. Zhang, G. Gettie, A. Luckay, L.N. Martin, E. Skulsky, D.D. Ho, C. Cheng-Mayer, and P.A. Marx. 2000. Normal T-cell turnover in sooty mangabeys harboring active simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 74: 1209-1223.
- Chakrabarti, L.A., S.R. Lewin, L. Zhang, A. Gettie, A. Luckay, L.N. Martin, E. Skulsky, D.D. Ho, C. Cheng-Mayer, P.A. Marx. 2000. Age-dependent changes in T cell homeostasis and SIV load in sooty

mangabeys. *J. Med. Primatol.* 29: 158-165.

- Chalifoux, L. V., D. Ringler, N. W. King, P. K. Seghal, R. C. Desroisiers, M. D. Daniel, and N. L. Letvin. 1987. Lymphadenopathy in macaques experimentally infected with simian immunodeficiency virus (SIV) *Am. J. Pathol.* 128: 104-110.
- Chen, Z., A. Luckay, D.L. Sodora, P.T. Telfer, P. Reed, A. Gettie, J.M. Kanu, R.F. Sadek, J.A. Yee, D.D. Ho, L. Zhang, P.A. 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.
- Clewley, J.P., J.C.M. Lewis, D.W.G. Brown, and E.L. Gadsby. 1998. A novel simian immunodeficiency virus (SIVdrl) pol sequence from the drill monkey, *Mandrillus leucophaeus*. *J. Virol.* 72: 10305-10309.
- Corbet, S., M.C. Müller-Trutwin, P. Versmisse P et al. 2000. env sequences of simian immunodeficiency virus from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J. Virol.* 74: 529-534.
- Courgnaud, V., X. Pourrut, F. Bibollet-Ruche, E. Mpoudi-Ngole, A. Bourgeois, E. Delaporte, and M. Peeters. 2001. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus from Guereza Colobus monkeys (*Colobus guereza*) in Cameroon: a new lineage in the nonhuman primate lentivirus family. *J. Virol.* 75: 857-866.
- Daniel, M.D., Y. Li, Y. Naidu, P.J. Durda, D.K. Schmidt, C.D. Troup, D.P. Silva, J.J. MacKey, H.W. Kestler, P.K. Seghal, N.W. King, Y. Ohta, M. Hayami, and R. Desrosiers. 1988. Simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *J. Virol.* 62: 4123-4128.
- Darby, S. C., D. W. Ewart, P. L. Giangrande, R. J. Spooner, and C. R. Rizza. 1996. Importance of age at infection with HIV-1 for survival and development of AIDS in UK haemophilia population. UK Haemophilia Centre Directors' Organisation. *Lancet* 347: 1573-1579.
- Deacon, N.J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D.J. Hooker, D.A. McPhee, A.L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, et al. 1995. Genomic structure of an attenuated quasispecies of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270: 988-991.
- Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, M. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S. J. O'Brien. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 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.
- Diop, O.M., A. Gueye, M. Dias-Tavares, C. Kornfeld, A. Faye, P. Ave, M. Huerre, S. Corbet, F. Barré-Sinoussi, and M.C. Müller-Trutwin. 2000. High levels of viral replication during primary simian immunodeficiency virus SIVagm infection are rapidly and strongly controlled in African green monkeys. *J. Virol.* 74: 7538-7547.



- Estaquier, J., T. Idziorek, F. de Bels, F. Barré-Sinoussi, B. Hurtrel, A.M. Aubertin, A. Venet, M. Mehtali, E. Muchmore, P. Michel, Y. Mouton, M. Girard, and J.C. Amiesen. 1994. Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and non-pathogenic primate lentiviral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9431-9435.
- Finkel, T., H.G. Tudor-Williams, N.K. Banda, M.F. Cotton, T. Curiel, C. Monks, T.W. Baba, R.M. Ruprecht, and A. Kupfer. 1995. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat. Med.* 1: 129-134.
- Fultz, P.N., T.P. Gordon, D.C. Anderson, and H.M. McClure. 1990. Prevalence of natural infection with simian immunodeficiency virus and simian T cell leukemia virus type 1 in a breeding colony of sooty mangabey monkeys. *AIDS* 4: 457-461.
- Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397: 436-441.
- Garred, P., J. Eugen-Olsen, A. K. Iversen, T. L. Benfield, A. Svejgaard, and B. Hofmann. 1997. Dual effect of CCR5 delta 32 gene deletion in HIV-1-infected patients. Copenhagen AIDS Study Group. *Lancet* 349: 1884.
- Georges-Courbot, M.C., C.Y. Lu, M. Makuwa et al. 1998. Natural infection of a household pet Red-Capped Mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 72: 600-608.
- Goldstein, S., I. Ourmanov, C.R. Brown, B.E. Beer, W.R. Elkins, R. Plishka, A. Buckler-White and V.M. Hirsch. 2000. Wide range of viral load in healthy African Green Monkeys Naturally infected with simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 74: 11744-11753.
- Gougeon, L.M., H. Lecoœur, A. Dulioust, M.G. Enouf, M. Curvoisier, C. Goujard, T. Debord, and L. Montagnier. 1996. Programmed cell-death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol.* 156: 3509-3520.
- Haase, A.T. 1999. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 625-656.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, P. M. Sharp. 2000. AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science* 287: 607-614.
- Harrer, T., E. Harrer, S. A. Kalams, T. Elbeik, S. I. Staprans, M. B. Feinberg, Y. Cao, D. D. Ho, T. Yilma, A. M. Caliendo, R. P. Johnson, S. P. Buchbinder, and B. D. Walker. 1996. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12: 585-592.
- Hartung, S., K. Boller, K. Cichutek, S.G. Norley, and R. Kurth. 1992. Quantitation of a lentivirus in its natural host: simian immunodeficiency virus in African green monkeys. *J. Virol.* 66: 2143-2149.

- Hellerstein, M., M.B. Hanley, D. Cesar, S. Siler, C. Papageorgopoulos, E. Wieder, D. Schmidt, R. Hoh, R. Neese, D. Macallan, S. Deeks, and J.M. McClune. 1999. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat. Med.* 5: 83-89.
- Mohri, H., S. Bonhoeffer, S. Monard, A.S. Perelson, and D.D. Ho. 1998. Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science.* 279: 1223-1227.
- Rosenzweig, M., M.A. Demaria, D.M. Harper, S. Friedrich, R.K. Jain, and R.P. Johnson. 1998. Increased rates of CD4+ and CD8+ T lymphocyte turnover in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6388-6393.
- Hirsch, V. M., G. A. Dapolito, S. Goldstein, H. McClure, P. Emau, P. N. Fultz, M. Isahakia, R. Lenroot, G. Myers, and P. R. Johnson. 1993. A distinct African lentivirus from Sykes' monkeys. *J. Virol.* 67: 1517-1528.
- Emau, P, H.M. McClure, M. Isahakia, J.G. Else, and P.N. Fultz. 1991. Isolation from African Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 65: 2135-2140.
- Hirsch, V. M., G. Dapolito, P. R. Johnson, W. R. Elkins, W. T. London, R. Montali, S. Goldstein, and C. Brown. 1995. Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication. *J. Virol.* 69:955-967.
- Hirsch, V. M., T. R. Fuerst, G. Sutter, M. W. Carroll, L. C. Yang, S. Goldstein, M. Piatak, Jr., W. R. Elkins, W. G. Alvord, D. C. Montefiori, B. Moss, and J. D. Lifson. 1996. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J. Virol.* 70: 3741-3752.
- Hirsch, V.M., B.J. Campbell, E. Bailes, R. Goeken, C. Brown, W.R. Elkins, M. Axthelm, M. Murphey-Corb, and P.M. Sharp. 1999. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIV) from L'Hoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*): implications for the origin of SIVmnd and other primate lentiviruses. *J. Virol.* 73: 1036-1045.
- Ho, D.D., A. Neumann, A. Perelson, W. Chen, J. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 373: 123-126.
- Huang, Y., W. A. Paxton, S. M. Wolinsky, A. U. Neumann, L. Zhang, T. Ho, S. Kang, D. Ceradini, Z. Jin, K. Yazdanbakhsh, K. Kunstman, D. Erickson, E. Dragon, N. R. Landau, J. Phair, D. D. Ho, and R. A. Koup. 1996. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 2: 1240-1243.
- Jassey, C., and B. D. Walker. 1997. HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and the control of HIV-1 replication. *Springer Semin. Immunopathol.* 18: 341-354.
- Jin, B.X., D.E. Bauer, S.E. Tuttleton, S. Lewin, A. Gettie, J. Blanchard, C.E. Irwin, J.T. Safrit, J. Mittler, L. Weinberger, L.G. Kostrikis, L. Zhang, A.S. Perelson, and D.D. Ho. 1999. Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.*

- Jin, M. J., J. Rogers, J. E. Phillips-Conroy, J. S. Allan, R. C. Desrosiers, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1994. Infection of a yellow baboon with simian immunodeficiency virus from African green monkeys: evidence for cross-species transmission in the wild. *J. Virol.* **68**: 8454-8460.
- Kaslow, R. A., M. Carrington, R. Apple, L. Park, A. Munoz, A. J. Saah, J. J. Goedert, C. Winkler, S. J. O'Brien, C. Rinaldo, R. Detels, W. Blattner, J. Phair, H. Erlich, and D. L. Mann.** 1996. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2**: 405-411.
- Kirchhoff, F., T.C. Greenough, D.B. Brettler, J.L. Sullivan, and R.C. Desrosiers.** 1995. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **332**: 228-232.
- Kostrikis, L. G., Y. Huang, J. P. Moore, S. M. Wolinsky, L. Zhang, Y. Guo, L. Deutsch, J. Phair, A. U. Neumann, and D. D. Ho.** 1998. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat. Med.* **4**: 350-353.
- Kraus, G., A. Werner, M. Bayer, D. Binninger, F.J. Ferdinand, S. Norley, and R. Kurth.** 1989. Isolation of human immunodeficiency viruses from African green monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 2892-2896.
- Lifson, J. D., M. A. Nowak, S. Goldstein, J. L. Rossio, A. Kinter, G. Vasquez, T. A. Wiltout, C. Brown, D. Schneider, L. Wahl, A. L. Lloyd, J. Williams, W. R. Elkins, A. S. Fauci, and V. M. Hirsch.** 1997. The extent of early viral replication is a critical determinant of the natural history of simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **71**: 9508-9514
- Liu, S.-L., T. Schacker, L. Musey, D. Shriner, M. J. McElrath, L. Corey, and J.I. Mullins.** 1997. Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J. Virol.* **71**: 4284-4295.
- Marthas, M.L., K.K.A. Van Rompay, M. Otsyula, C.J. Miller, D.R. Canfield, N.C. Pedersen, and M.B. McChesney.** 1995. Viral factors determine progression to AIDS in simian immunodeficiency virus-infected newborn rhesus macaques. *J. Virol.* **69**: 4198-4205.
- Martin, M. P., M. Dean, M. W. Smith, C. Winkler, B. Gerrard, N. L. Michael, B. Lee, R. W. Doms, J. Margolick, S. Buchbinder, J. J. Goedert, T. R. O'Brien, M. W. Hilgartner, D. Vlahov, S. J. O'Brien, and M. Carrington.** 1998. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* **282**: 1907-1911.
- McClure, H. M., D. C. Anderson, P. N. Fultz, A. A. Ansari, E. Lockwood, and A. Brodie.** 1989. Spectrum of disease in macaque monkeys chronically infected with SIV/SMM. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **21**: 13-24
- Mellors, J. W., A. Munoz, J. V. Giorgi, J. B. Margolick, C. J. Tassoni, P. Gupta, L. A. Kingsley, J. A. Todd, A. J. Saah, R. Detels, J. P. Phair, and C. R. Rinaldo, Jr.** 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann. Intern. Med.* **126**: 946-954

- Mellors, J.W., C.R.Rinaldo, Jr., P. Gupta, R.M. White, J.A. Todd, and L.A. Kingsley.** 1996. Prognosis of HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272: 1167-1170.
- Michael, N. L., A. E. Brown, R. F. Voigt, S. S. Frankel, J. R. Mascola, K. S. Brothers, M. Louder, D. L. Birx, and S. A. Cassol.** 1997. Rapid disease progression without seroconversion following primary human immunodeficiency virus type 1 infection: evidence for highly susceptible human hosts. *J. Infect. Dis.* 175: 1352-1359.
- Murayama, Y., A. Amaro, R. Mukay, H. Shibata, S. Matsunaga, H. Takahashi, Y. Yoshikawa, M. Hayami and A. Noguchi.** 1997. CD4 and CD8 expressions in African green monkeys helper T lymphocytes: implication for resistance to SIV infection. *Intern. Immunol.* 9: 843-851.
- Murayama, Y., R. Mukay, M. Inoue-Murayama, and Y. Yoshikawa.** 1999. An African green monkey lacking peripheral CD4 lymphocytes that retains helper T cell activity and coexists with SIVagm. *Clin. Exp. Immunol.* 117: 504-512.
- Nerrienet, E., X. Amouretti, M.C. Muller-Trutwin, V. Poaty-Mavoungou, I. Bedjebaga, H.T. Nguyen, G. Dubreuil, S. Corbet, E.J. Wickings, F. Barre-Sinoussi, A.J. Georges, M.C. Georges-Courbot.** 1998. Phylogenetic analysis of SIV and STLV type I in mandrills (*Mandrillus sphinx*): indications that intracolony transmissions are predominantly the result of male-to-male aggressive contacts. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 14: 785-796.
- Nowak, M. A., A. L. Lloyd, G. M. Vasquez, T. A. Wiltrout, L. M. Wahl, N. Bischofberger, J. Williams, A. Kinter, A. S. Fauci, V. M. Hirsch, and J. D. Lifson.** 1997. Viral dynamics of primary viremia and antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 71: 7518-7525
- O'Brien, T., W.A. Blattner, D. Waters, E. Eyster, M.W.Hilgartner, A.R.Cohen, N.Luban, A. Hatzakis, L.M.Aledort, P.S. Rosenberg, W.J. Miley, B.L. Kroner, J.J. Goedert, et al.** 1996. Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the multicenter hemophilia cohort study. *JAMA* 276: 105-110.
- O'Neil, S.P., F.J. Novembre, A. Brodie Hill, C. Suwyn, C.E. Hart, T. Evans-Strickfaden, D.C. Anderson, J. deRosayro, J.G. Herndon, M. Saucier, and H.M. McClure.** 2000. Progressive Infection in a Subset of HIV-1 Positive Chimpanzees. *J. Infect. Dis.* 182: 1051-1062.
- Operskalski, E. A., J. W. Mosley, M. P. Busch, and D. O. Stram.** 1997. Influences of age, viral load, and CD4+ count on the rate of progression of HIV-1 infection to AIDS. Transfusion Safety Study Group. *J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 15: 243-244.
- Operskalski, E. A., M. P. Busch, J. W. Mosley, and D. O. Stram.** 1997. Comparative rates of disease progression among persons infected with the same or different HIV-1 strains. The Transfusion Safety Study Group. *J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 15: 145-150.
- Pantaleo, G., and A. S. Fauci.** 1995. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 487-512.
- Pantaleo, G., J. F. Demarest, H. Soudeyns, C. Graziosi, F. Denis, J. W. Adelsberger, P. Borrow, M. S. Saag, G. M. Shaw, and R. P. Sekaly.** 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., J. F. Demarest, T. Schacker, M. Vaccarezza, O. J. Cohen, M. Daucher, C. Graziosi, S. S. Schnittman, T. C. Quinn, G. M. Shaw, L. Perrin, G. Tambussi, A. Lazzarin, R. P. Sekaly, H. Soudeyns, L. Corey, and A. S. Fauci.** 1997. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 254-258.
- Perelson, A., A. Neumann, M. Markowitz, J. Leonard, and D.D. Ho.** 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271: 1582-1586.
- Rey-Cuille, M.A., J.L. Berthier, M.C. Bomsel-Demontoy, Y. Chaduc, L. Montagnier, A.G. Hovanessian, L.A. Chakrabarti.** 1998. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. *J. Virol.* 72: 3872-3886.
- Rosenberg, E. S., J. M. Billingsley, A. M. Caliendo, S. L. Boswell, P. E. Sax, S. A. Kalams, and B. D. Walker.** 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278: 1447-1450.
- Rosenberg, Y.J., M.G. Lewis, E.C. Leon, A. Cafaro, G.A. Eddy, J.J. Greenhouse.** 1994. Viral DNA burden and decline in percentage of CD4-positive cells in the lymphoid compartment of SIV-infected macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1269-1277.
- Schwartz, D. H., R. C. Castillo, S. Arango-Jaramillo, U. K. Sharma, H. F. Song, and G. Sridharan.** 1997. Chemokine-independent in vitro resistance to human immunodeficiency virus (HIV-1) correlating with low viremia in long-term and recently infected HIV-1-positive persons. *J. Infect. Dis.* 176: 1168-1174.
- Sharp, P. M., L. Bailes, D. L. Robertson, F., Gao, and B. H. Hahn.** 1999. Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol. Bull.* 196: 338-342.
- Simon, F, S. Souquière, F. Damond, M. Makuwa, E. Leroy, P. Rouquet, J.-L. Berthier, J. Rigoulet, A. Lecu, P.T. Telfer, I. Pandrea, J.C. Plantier, F. Barré-Sinoussi, P. Roques, M.C. Müller-Trutwin, and C. Apetrei.** 2001. A Synthetic Peptide Strategy for the Detection of and Discrimination among Highly Divergent Primate Lentiviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 17: in press.
- Simon, J.H.M., D.L. Miller, R.A.M. Fouchier, M.A. Soares, K.W.C. Peden, and M.H. Malim.** 1998. The regulation of primate immunodeficiency virus infectivity by Vif is cell species restricted: a role for Vif in determining virus host range and cross-species transmission. *EMBO J.* 17: 1259-1267.
- Simon, M. A., S. J. Brodie, V. G. Sasseville, L. V. Chalifoux, R. C. Desrosiers, and D. J. Ringler.** 1994. Immunopathogenesis of SIVmac. *Virus Res.* 32: 227-251.
- Smith, M. W., M. Dean, M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, D. A. Lomb, J. J. Goedert, T. R. O'Brien, L. P. Jacobson, R. Kaslow, S. Buchbinder, E. Vittinghoff, D. Vlahov, K. Hoots, M. W. Hilgartner, and S. J. O'Brien.** 1997. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 277: 959-965.

- Sodora, D.L., F. Lee, P.J. Dailey, and P.A. Marx.** 1998. A genetic and viral load analysis of the simian immunodeficiency virus during the acute phase in macaques inoculated by the vaginal route. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14: 171-181.
- Trivedi, P., D. Horejsh, S.B. Hinds, P.W. Hinds II, M.S. Wu, M.S. Salvato, and C.D. Pauza.** 1996. Intrarectal transmission of simian immunodeficiency virus in rhesus macaques: selective amplification and host responses to transient or persistent viremia. *J. Virol.* 70: 6876-6883.
- Tsujimoto, H, R.W. Cooper, T. Kodama, M. Fukasawa, T. Miura, Y. Ohta, K. Ishikawa, M. Nakai, E. Frost, G.E. Roelants, et al.** 1988. Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 62: 4044-4050.
- Tsujimoto, H., A. Hasegawa, N. Maki, M. Fukasawa, T. Miura, S. Spiedel, R.W. Cooper, E.N. Moriyama, T. Gojobori, and M. Hayami.** 1989. Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill. *Nature* 341: 539-541.
- Vall, P.J.S., V.V. Lukashov, J.L. Heeney, and J. Goudsmit.** 1998. Shortening of the symptom-free period in rhesus macaques is associated with decreasing nonsynonymous variation in the *env* variable regions of simian immunodeficiency virus SIVsm during passage. *J. Virol.* 72: 7494-7500.
- Van Rensburg, E. J., S. Engelbrecht, J. Mwenda, J. D. Laten, B. A. Robson, T. Stander, and G. K. Chege.** 1998. Simian immunodeficiency viruses (SIVs) from eastern and southern Africa: detection of a SIVagm variant from a chacma baboon. *J. Gen. Virol.* 79: 1809-1814.
- Wallach, J.D.** 1979. The mechanics of nutrition for exotic pets. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 9: 405-414.
- Watson, A., J. Ranchalis, B. Travis, J. McClure, W. Sutton, P. R. Johnson, S.-L. Hu, and N. L. Haigwood.** 1997. Plasma viremia in macaques infected with simian immunodeficiency virus: plasma viral load early in infection predicts survival. *J. Virol.* 71:284-290
- Wei, X., S.K. Ghosh, M.E. Taylor, V.A. Johnson, E.A. Emini, P. Deutsch, J.D. Lifson, S. Bonhoeffer, M.A. Nowak, B.H. Hahn et al.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 373: 117-122.
- Winkler, C., W. Modi, M. W. Smith, G. W. Nelson, X. Wu, M. Carrington, M. Dean, T. Honjo, K. Tashiro, D. Yabe, S. Buchbinder, E. Vittinghoff, J. J. Goedert, T. R. O'Brien, L. P. Jacobson, R. Detels, S. Donfield, A. Willoughby, E. Gomperts, D. Vlahov, J. Phair, and S. J. O'Brien.** 1998. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* 279: 389-393.
- Yang, O. O., and B. D. Walker.** 1997. CD8+ cells in human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis: cytolytic and noncytolytic inhibition of viral replication. *Adv. Immunol.* 66: 273-311.
- Souquière, S., F. Bibollet-Ruche, D.L. Robertson, M. Makuwa, C. Apetrei, R. Onanga, C. Kornfeld, J.C. Plantier, F. Gao, K. Abernethy, L.J.T. White, W. Karesh, P.T. Telfer, E.J. Wickings, P. Maucière,**

# Viral and host dynamics during SIVmnd-1 primary infection in *Mandrillus sphinx*

## Figure and table legends:

**Figure 1.** Serological responses in the study group during the SIVmnd-1 infection in *Mandrillus sphinx*. a. commercial screening assay (Genelavia Mixt-Bio-Rad) seroconversion. b. anti-gp36 antibody dynamics; c. anti-V3 antibodies.

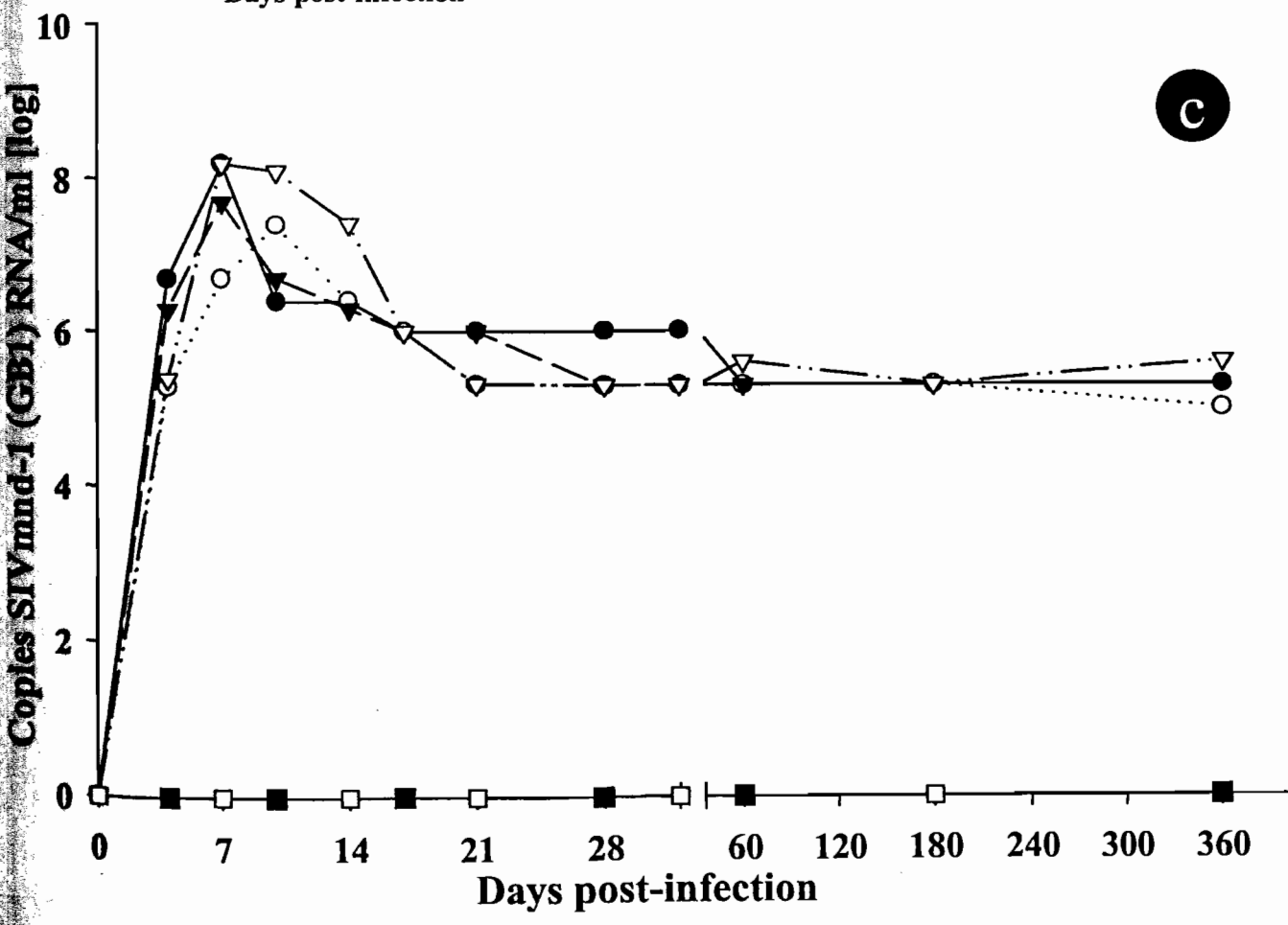
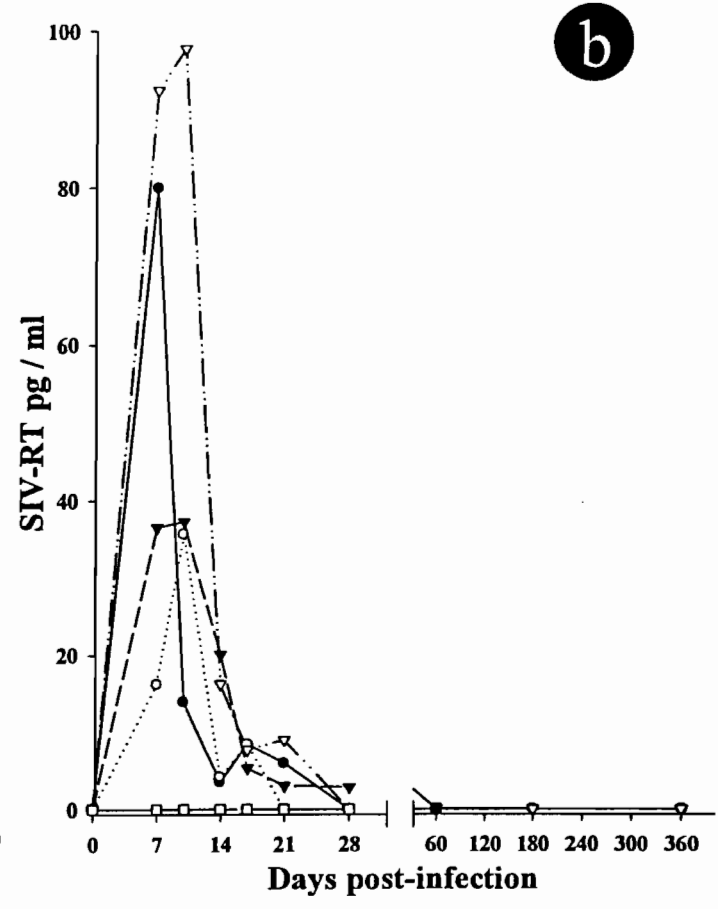
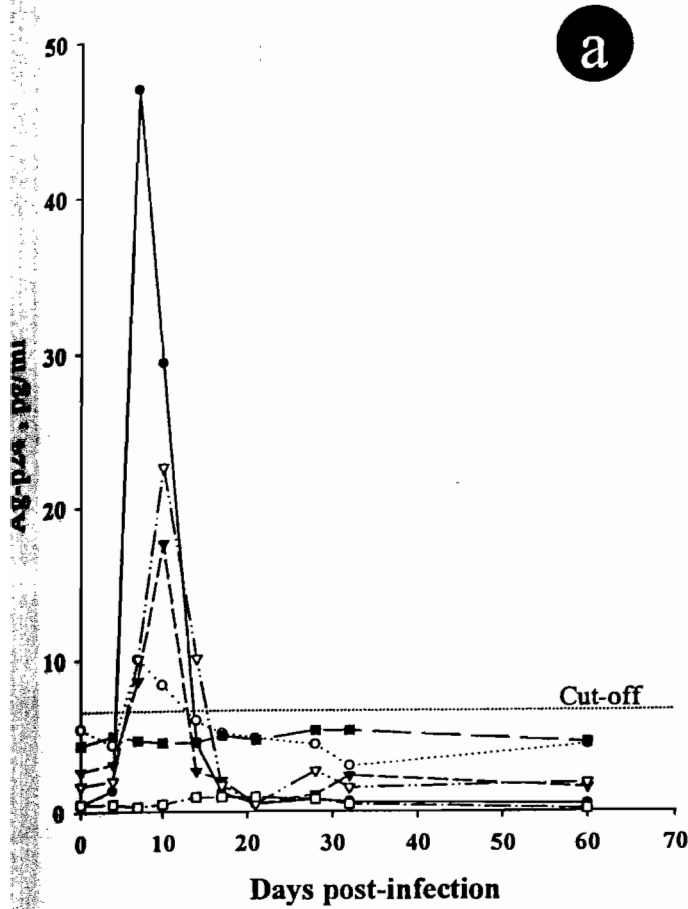
**Figure 2.** Viral dynamics during experimental SIVmnd-1 primary infection in *M. sphinx*. a. p24 Ag activity (Sanofi Pasteur); b. Revers-transcriptase activity (Cavidi method); c. Plasma SIVmnd-1 RNA load (QC-PCR).

**Figure 3.** Viral isolation patterns in infected animals. Cultures were performed at days 11 and 60 post-infection on plasma virus.

**Figure 4.** Lymphocyte dynamics during experimental SIVmnd-1 primary infection in *M. sphinx*. a. CD4<sup>+</sup> lymphocytes counts dynamics in infected animals and control animals; b. CD8<sup>+</sup> lymphocytes dynamics in infected animals and control animals. (#12A4 [●]; #10G [○]; #12C2 [▼]; #2C2 [▽]; #5H [■]; #2I [□]).

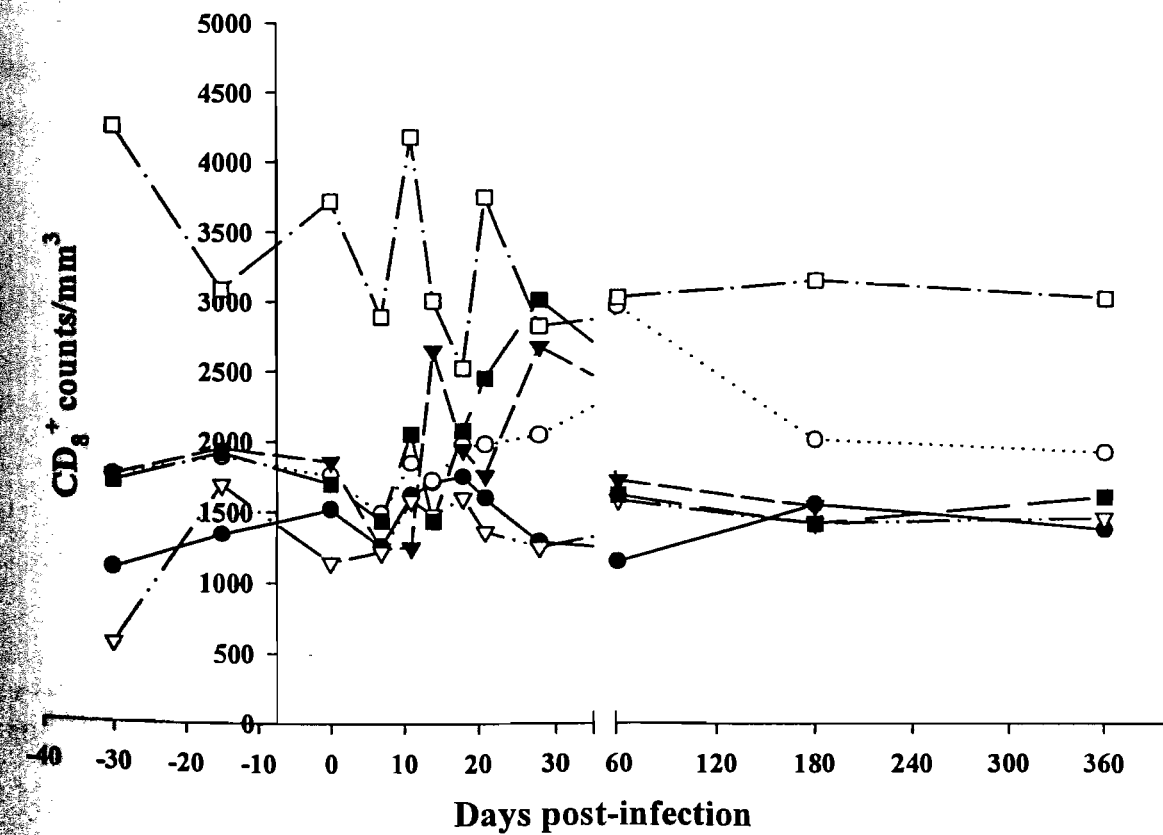
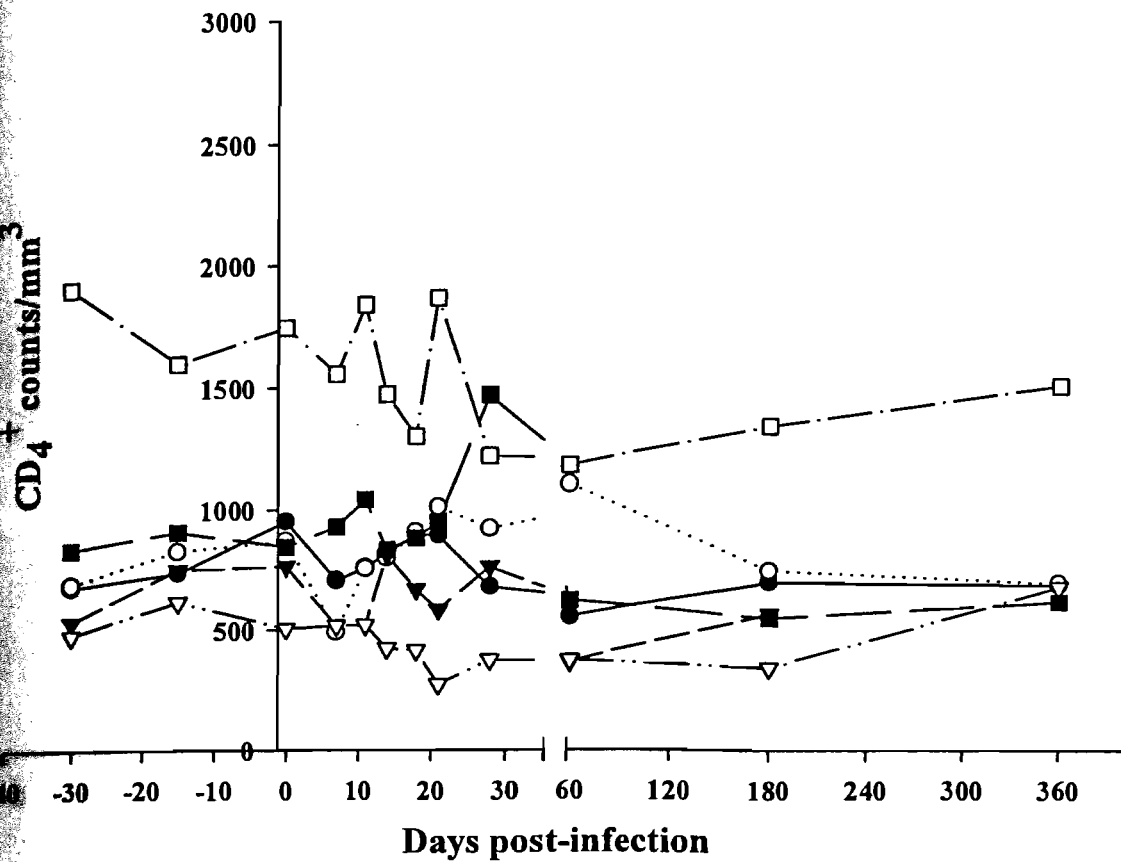
**Figure 5.** Mean of the CD4<sup>+</sup> [●] and CD8<sup>+</sup> [○] cell counts in infected mandrills *versus* the control mandrills [CD4<sup>+</sup> (▼) cells; CD8<sup>+</sup> (▽) cells] in a. peripheral blood and b. lymph nodes.

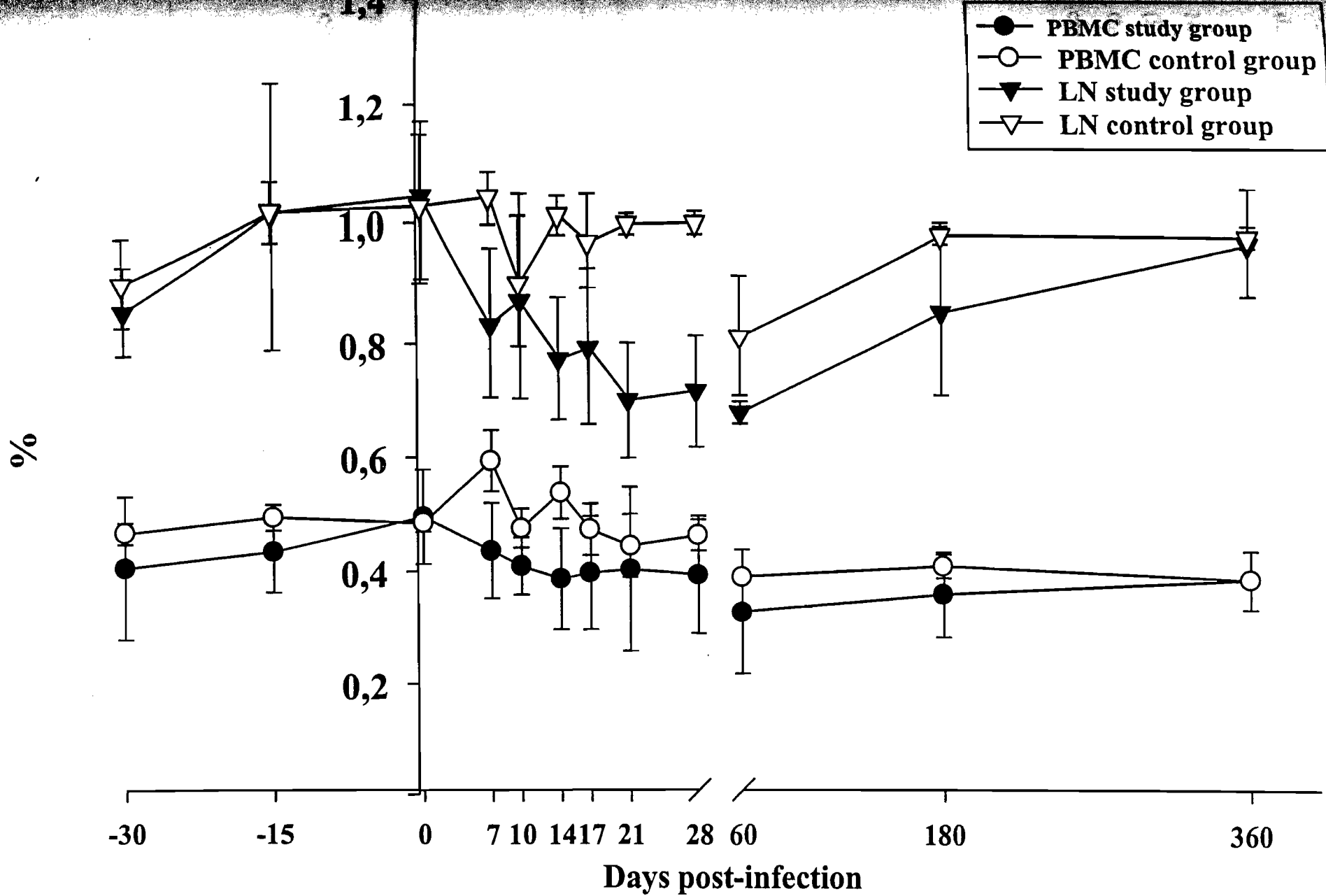
**Figure 6.** CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratios in peripheral blood in infected [●] and control [○] animals and in lymph nodes in infected [▼] versus control animals [▽].



Study group				Control group	
● 12A4	○ 10G	▼ 12C2	▽ 2C2	■ 5H	□ 2I

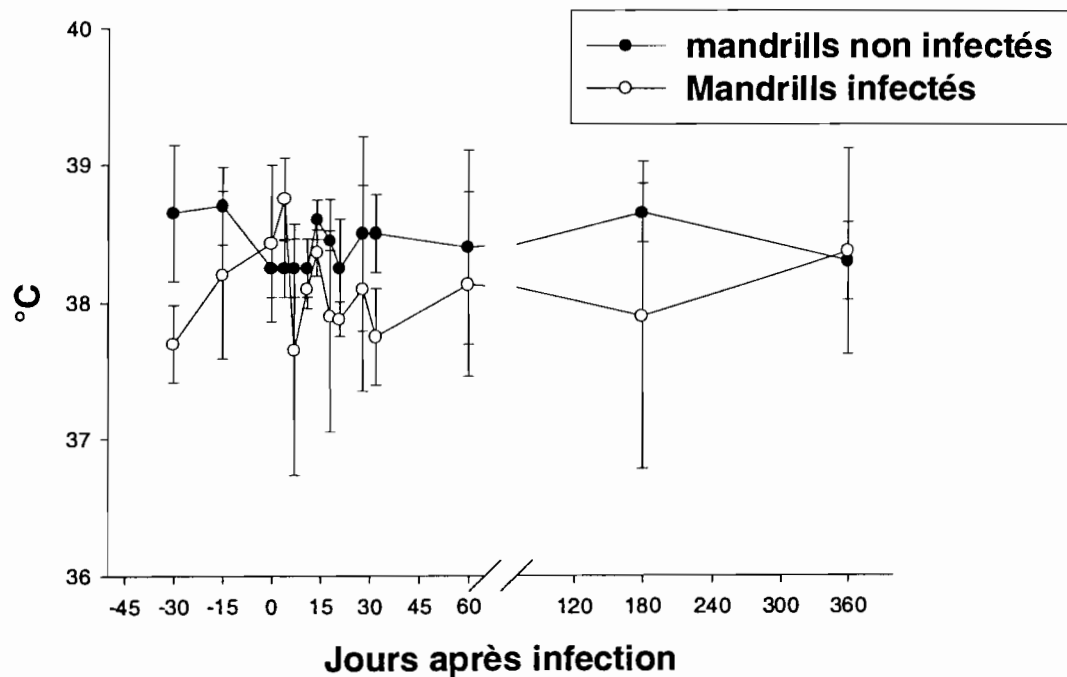




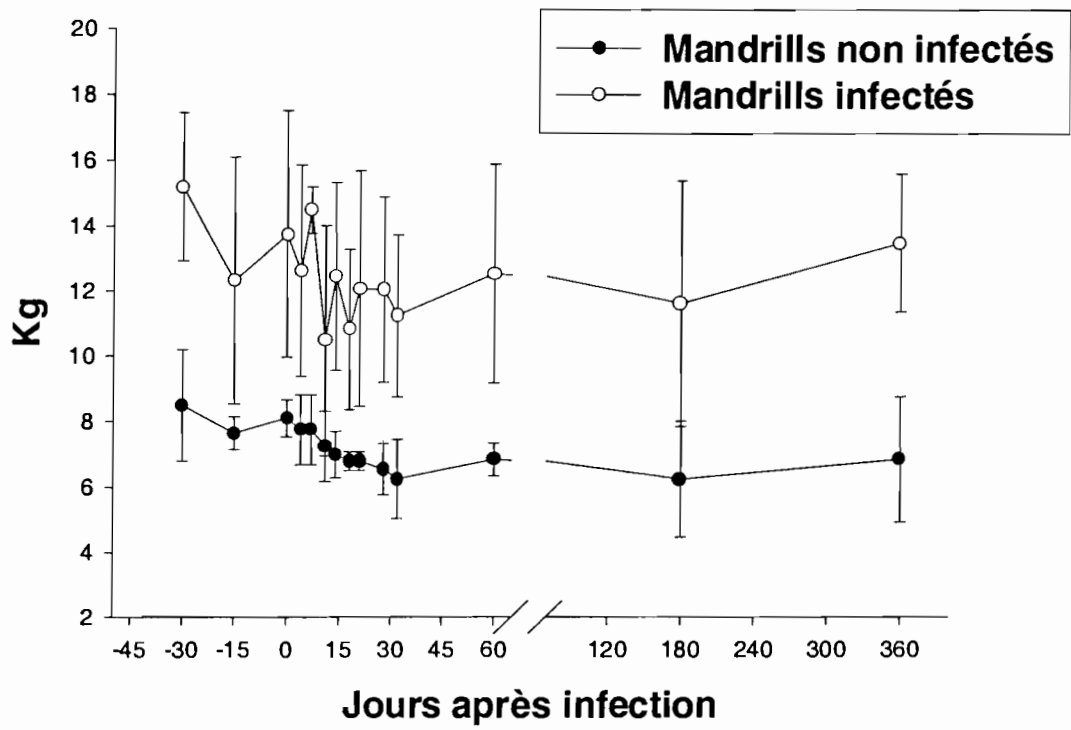


### 1.3. Résultats complémentaires du suivi clinique, virologiques et biologiques au cours de la primo-infection SIVmnd-1 chez le mandrill:

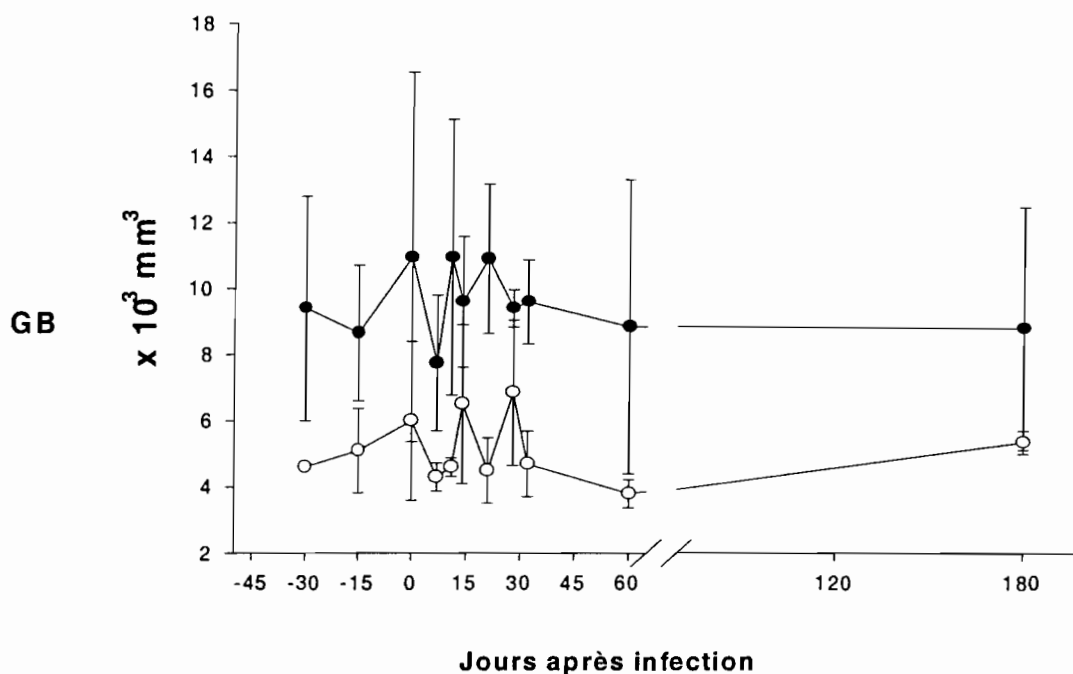
Nous avons réalisé un suivi des paramètres cliniques (courbes de poids et températures) (Figures 16 et 17) et hématologiques (numération et formule sanguine), (Figures 18, 19 et 20). Ces données ne montrent aucun changement significatif des paramètres entre les animaux contrôles et ceux infectés.



**Figure 16: Courbes des températures au cours de l'infection SIVmnd-1 chez le *Mandrillus sphinx***

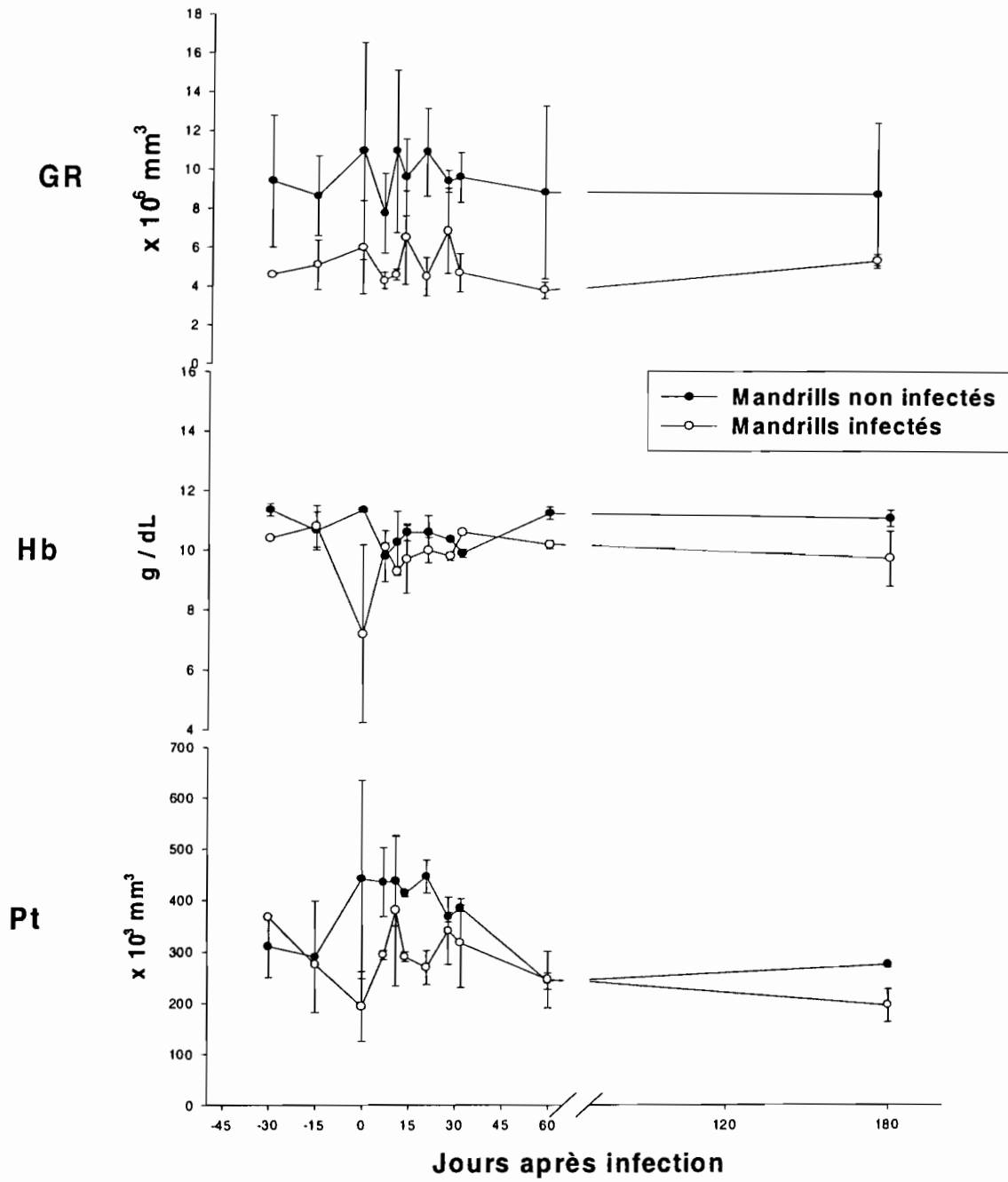


**Figure 17: Courbes de poids au cours de l'infection SIVmnd-1 chez le *Mandrillus sphinx***

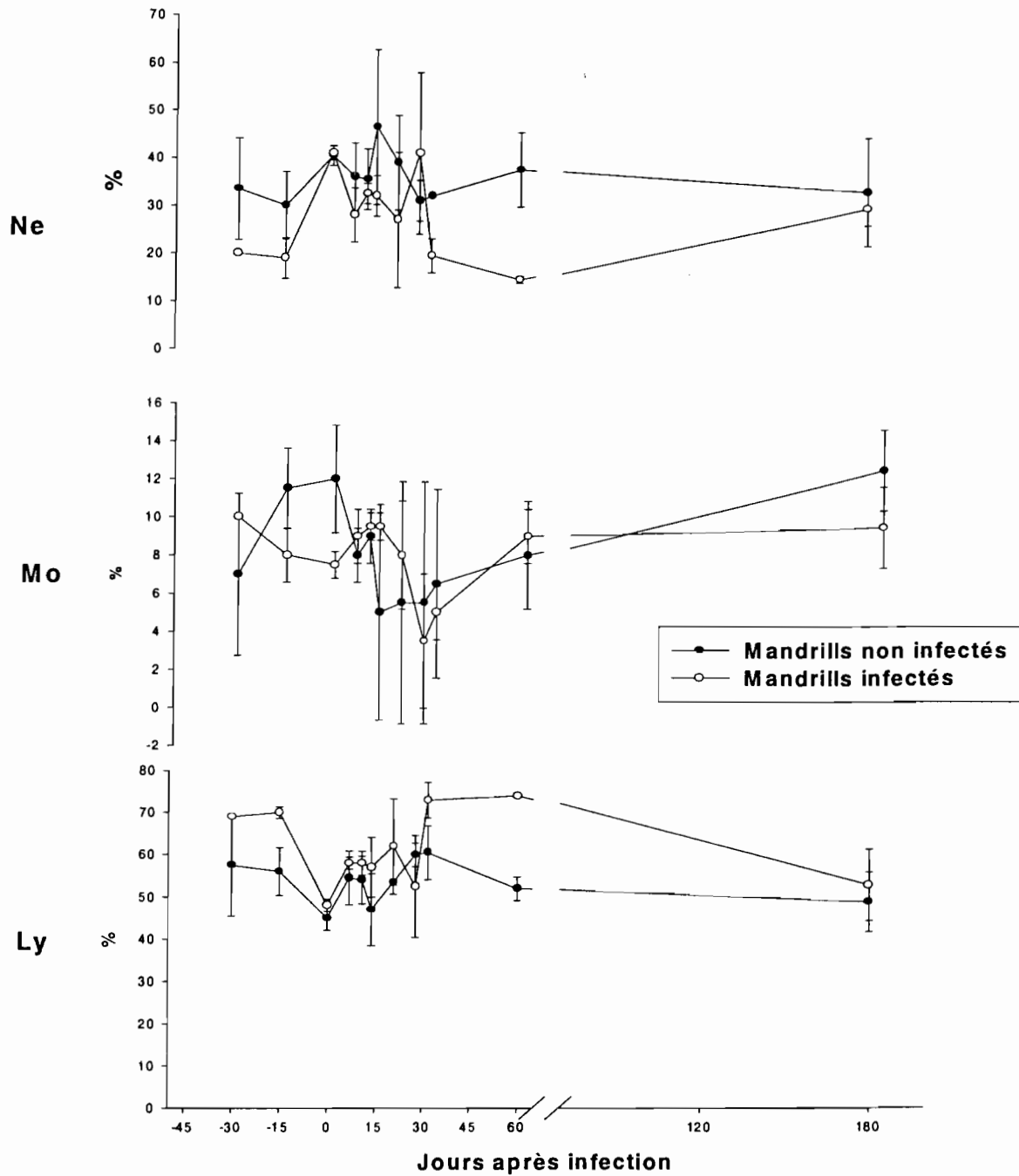


**Figure 18: Evolution des globules blancs (GB) au cours de l'infection SIVmnd-1 chez le *Mandrillus sphinx***

Dans la figure 16, nous pouvons remarquer qu'il y a une hétérogénéité entre les animaux. En effet, il n'y a pas de différence significative entre le nombre de globules blancs (Figure 16), de globules rouges, plaquettes ou hémoglobines (Figure 17), et pour les pourcentages des neutrophiles, monocytes et lymphocytes (Figure 18). Par ailleurs, il a été observé une hypoglobulinémie par rapport aux données de Peinaldo et *al.* (voire Tableau 3). L'animal 2I du groupe témoin a toujours eu des valeurs très supérieures à la normale pour les GB et les GR, ce qui explique le décalage observé entre les deux groupes indépendamment de l'infection.

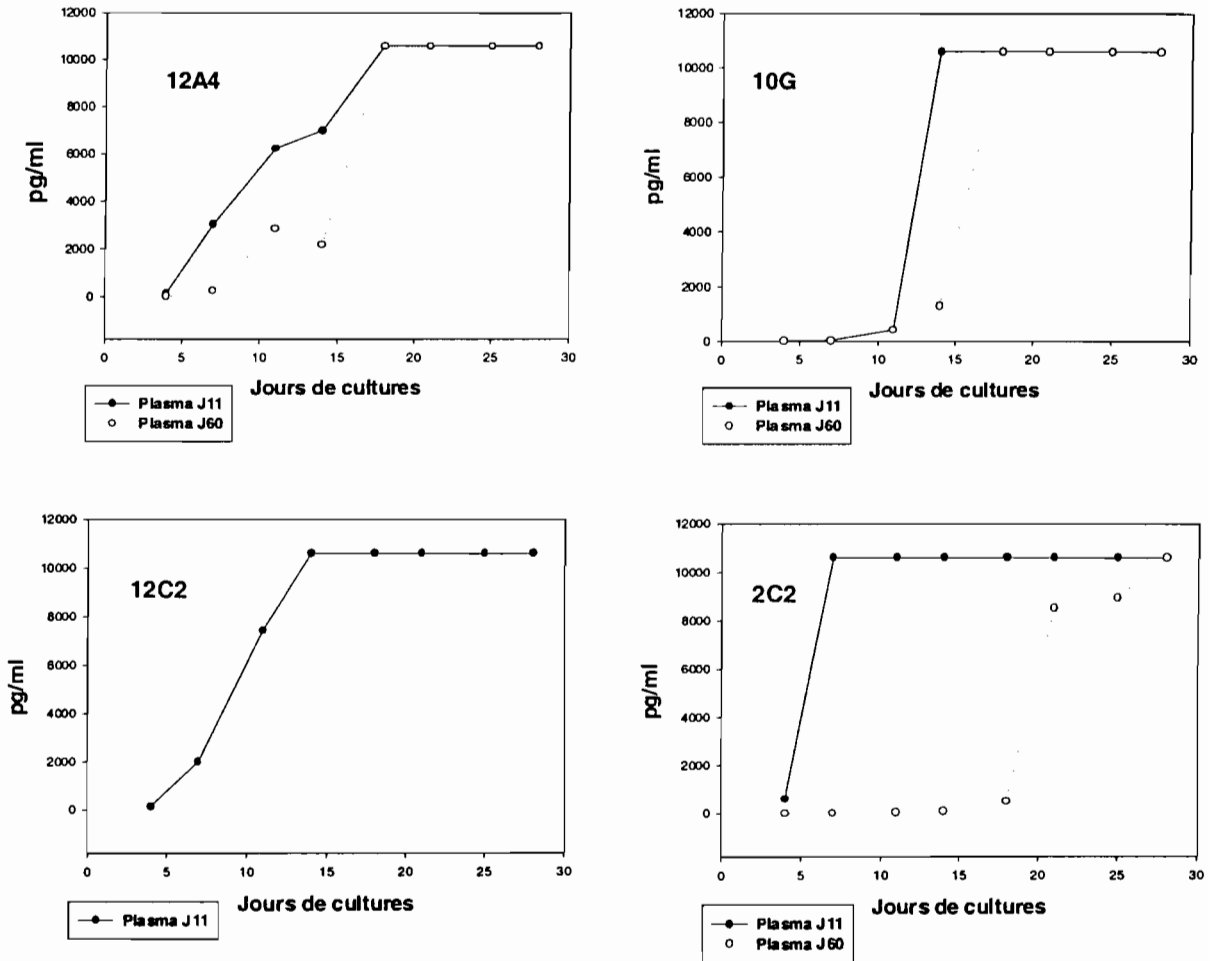


**Figure 19: Evolution des globules rouges (a), hémoglobines (b) et des plaquettes (c), cours de l'infection SIVmnd-1 chez le *Mandrillus sphinx***



**Figure 20: Evolution des neutrophiles (a), monocytes (b) et des lymphocytes (c), au cours de l'infection SIVmnd-1 chez le *Mandrillus sphinx***

Nous avons également isolé le SIVmnd-1 dans les surnageants après culture du plasma sur les cellules Supt1, en mesurant l'activité de la RT (reverse transcriptase) exprimée en pg/ml (Figure 21). Les résultats montrent un profil d'isolement viral en culture identique pour les quatre animaux infectés. L'apparition du virus dans les surnageants de culture est corrélée avec le profil de la virémie plasmatique.



**Figure 21: Isolement viral plasmatique à J11 et J60 du SIVmnd-1 au cours de la primo-infection chez le *Mandrillus sphinx***



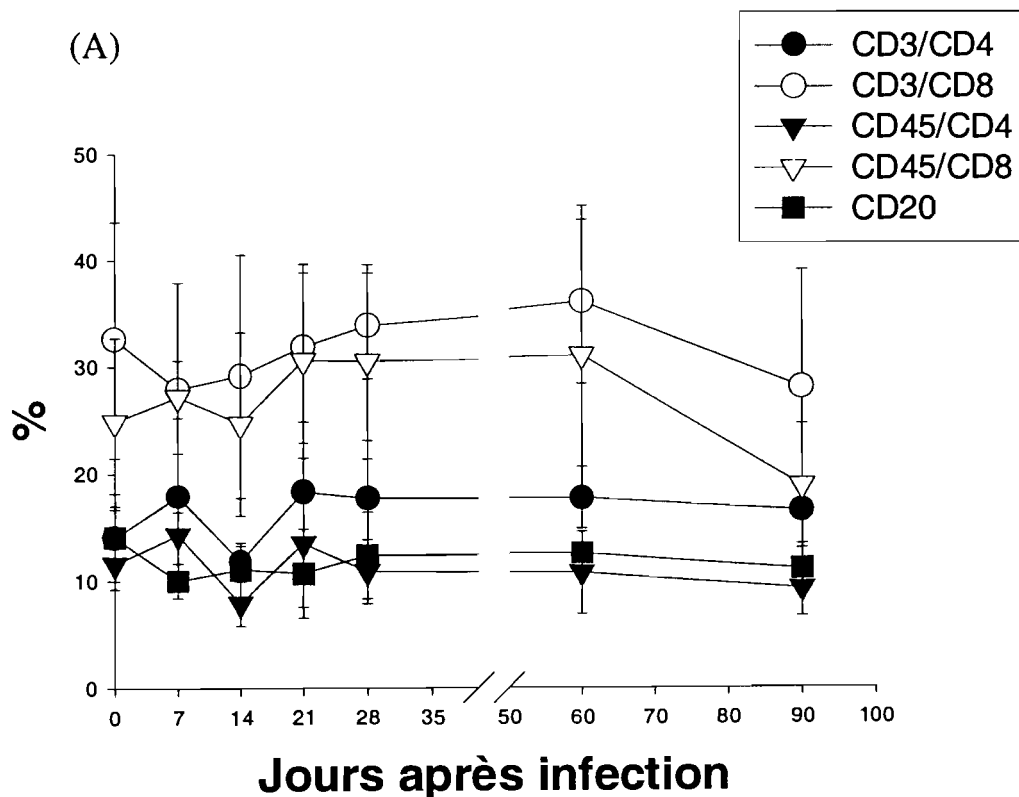
#### 1.4. Marqueurs complémentaires de la réponse cellulaire au cours de la primo-infection SIVmnd-1 chez le mandrill

Nous avons complété les résultats de réponse immune cellulaire obtenus en primo-infection SIVmnd-1, et dans lesquels aucune modification des CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> n'était constatée.

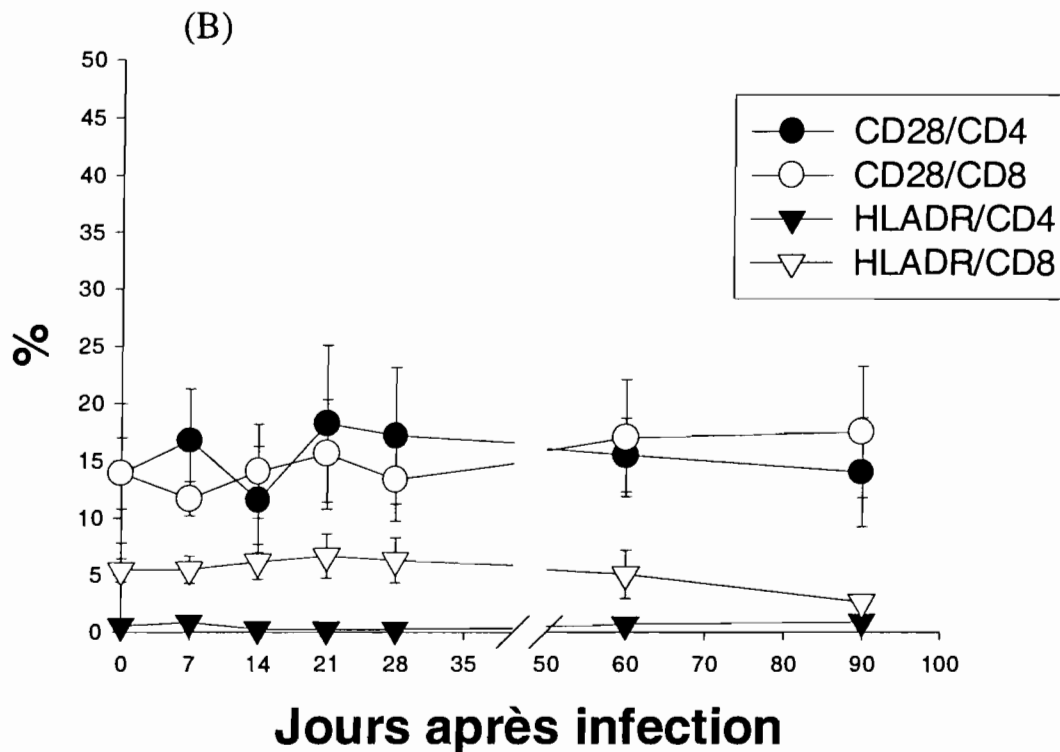
Pour cela, dans le cadre de l'étude de la transmission materno-fœtale, nous avons infecté cinq mandrills femelles après accouchement avec 1 ml de plasma SIVmnd-1 (300 TCID50), et nous avons étudié l'état d'activation des populations cellulaires.

Figure 22: Marqueurs complémentaires au cours de la primo-infection des mandrills infectés par SIVmnd-1.

#### Evolution des différentes sous populations lymphocytaires au cours de la primo-infection SIVmnd-1 chez le mandrill



**Activation des différentes sous populations lymphocytaires  
au cours de la primo-infection SIVmnd-1  
chez le mandrill**



Ces marquages complémentaires (Transmission materno-fœtale) montrent une chute modéré des lymphocytes CD4<sup>+</sup> autour du pic viral (entre J7 et J17) (A) (B), suivie d'une reprise de l'activité cellulaire, et d'une augmentation modéré non significative des CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, il n'a été observé aucune activation significative des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et des sous populations naïves (A). Par contre, l'on note une activation transitoire et modéré des CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> après infection par le SIVmnd-1 (B).

### 1.5. Le virus SIVmnd-1 de primo-infection utilise respectivement le CCR5, puis Bob et Bonzo

Nous avons caractérisé le tropisme du virus SIVmnd-1 isolé au cours de la primo-infection. Des dilutions sériées de plasma à J 10 du singe 16E titré à 3000 TCID50 sur cellules SupT 1 ont servi à infecter des cellules Ghost (Chap. Mat. & Méth 2.8). Les résultats (Tableau 10) montrent, qu'en dehors du virus résiduel détecté dans les surnageants de culture au jour 3 de l'infection, le SIVmnd-1 utilise d'abord le corécepteur CCR5, puis respectivement Bob et Bonzo.

**Tableau 10: Culture de plasma 16Ej10 (3000 TCID50) sur les lignées Ghost exprimant les différents co-récepteurs. Les résultats sont exprimés en D.O. (cultures positives en grisées).**

Jours de cultures	Cellules Dilutions	parents	Bob	Bonzo	CXR4	CCR5
J4	10 <sup>0</sup>	444	617	753	668	612
J7	10 <sup>0</sup>	241	383	845	457	249
J10	10 <sup>0</sup>	33	441	630	133	826
J14	10 <sup>0</sup>	3	581	469	9	353
J4	10 <sup>-1</sup>	55	71	177	164	65
J7	10 <sup>-1</sup>	33	38	95	16	40
J10	10 <sup>-1</sup>	1,4	84	122	20	971
J14	10 <sup>-1</sup>	0,4	1840	152	3	614
J4	10 <sup>-2</sup>	9	10	1	0,7	0,4
J7	10 <sup>-2</sup>	0,4	6	29	0,1	0
J10	10 <sup>-2</sup>	0,1	0,5	32	3	0
J14	10 <sup>-2</sup>	0	0	22	6	246

La faible infectivité du virus pour les cellules Ghost indique qu'il existe peut être un autre corécepteur à ce virus absent des cellules Ghost, comme cela a été supposé pour les virus de singes verts.

## 1.6. Etude de la charge virale, de la réponse immune humorale et cellulaire durant la phase chronique SIVmnd-1.

Compte tenu des données obtenues au cours du présent protocole, nous avons initié une étude de l'évolution de la charge virale pendant la phase chronique de l'infection SIVmnd-1.

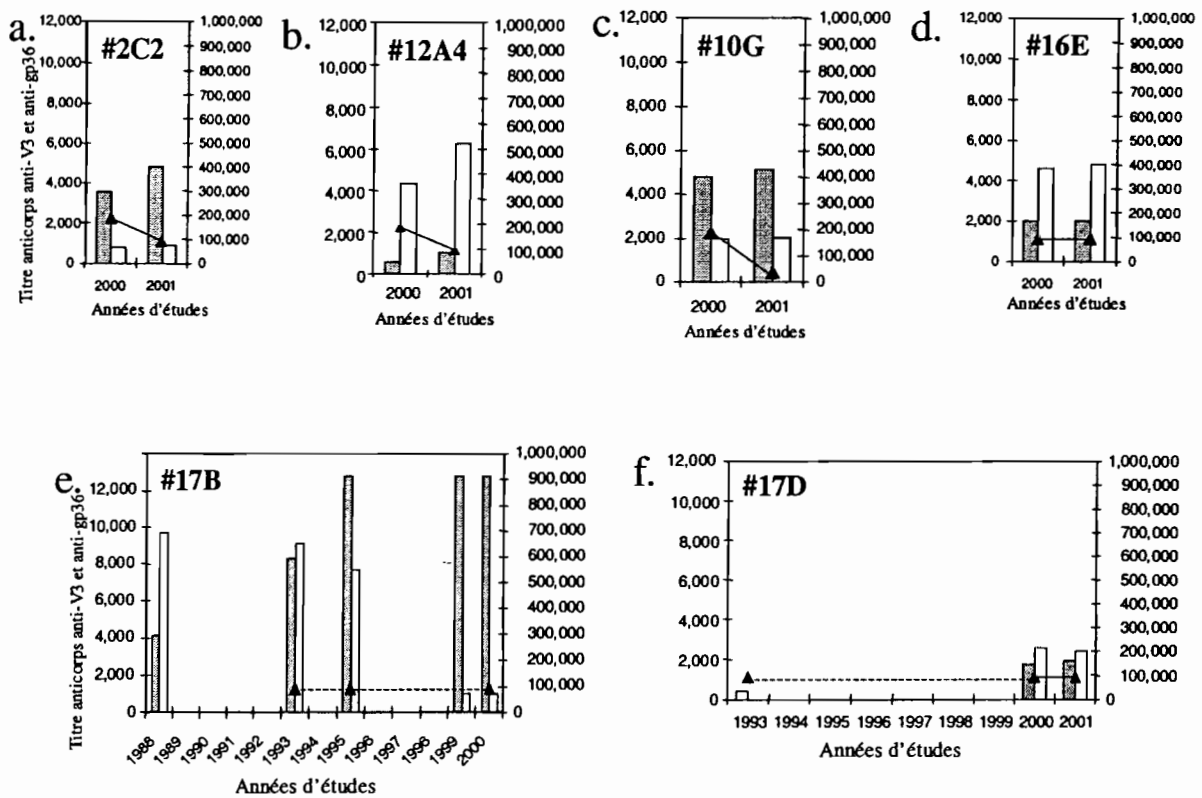
Les buts de cette étude étaient ;

- (i) D'évaluer la réplication du virus face à la réponse immune et la comparer avec d'autres modèles non-pathogènes et pathogènes.
- (ii) De comparer l'évolution de la phase chronique entre animaux infectés expérimentalement et naturellement.
- (iii) D'établir une relation entre les taux de charge virale et les facteurs immunitaires (réponse anticorps et marqueurs immuno-phénotypiques)

Les charges virales chroniques restent élevées et comparables à celles observées à la fin de la phase aiguë («*viral set point*») et restent stables aux cours des années ( $5 \pm 0,42$  Log copies par ml de plasma), avec des variations non significatives pour un même animal et entre mandrills infectés par SIVmnd-1. Les charges virales mesurées pour les animaux infectés expérimentalement sont similaires à celles obtenues chez les animaux naturellement infectés (Figure 23).

Le titre en anticorps reste élevé et constant au cours du suivi. Il est similaire entre les animaux expérimentalement infectés et ceux naturellement infectés.

Aucune différence significative, n'a été observé quant à l'activation des populations cellulaires en comparaison avec les témoins négatifs. L'activation des lymphocytes T (CD4-CD28, CD8-CD28).(Tableau 11), ne semble pas exclusivement liée à l'infection SIVmnd et au maintien de l'équilibre de la charge virale mais peut contribuer dans le contrôle de la réplication virale chez les singes d'Afrique.



**Figure 23: Evolution de la charge virale (▲) et du titre anticorps anti-V3 (□) et anti-gp36 (■) chez mandrills infectés par SIVmnd-1 expérimentalement (a-d), et naturellement (e; f) durant la phase chronique**

**Tableau 11 : Marqueurs d'activation cellulaire entre les mandrills infectés par SIVmnd-1 au cours de la phase chronique (10G, 12A4, 2C2, 17D, 17)**

Marqueurs	10G	12A4	2C2	17D	17
CD3/CD4	18,52	18,24	14,43	16,25	6,6
CD3/CD8	37,17	31,5	42,55	34,9	34,4
CD45/CD4	12,68	11,49	6,5	Nf	4,6
CD45/CD8	40,2	27,01	50,08	Nf	28
CD28/CD4	16,94	16,79	13,88	13,77	6
CD28/CD8	19,64	18,31	14,55	21,52	26
HLADR/CD4	0,66	0,26	0,2	0,83	12
HLADR/CD8	6,32	6,16	6,7	10,23	2,3
CD20	17,7	18,18	10,25	16,21	31,57

Nf : non fait

**Article 5:**

Chronic SIV infection ultimately causes immunodeficiency in African  
Non-human primates

Ivona Pandrea, **Richard Onanga**, Pierre Rouquet, Olivier Bourry, Paul Ngari, Jean E. Wickings, Pierre Roques and Christian Apetrei

2001. AIDS, (15), 2459-2470

Chez un des animaux inclus (F17) dans le protocole d'étude de l'infection chronique, âgé approximativement de 20 ans, et infecté avant 1983 date de son arrivée dans la colonie du CIRMF, on a observé, après un suivi de 18 ans une chute des CD4+ (19% en 1995 versus 6,6% en 2000), avec une augmentation corrélative de la charge virale ( $>0,5$  log), une diminution parallèle des titres en anticorps anti-V3 et anti-gp36, et une augmentation significative des pourcentages des CD20 et CD8/CD28 (Figure 24).

L'ensemble des données observées suggère une immunodépression et montrent que même chez les singes africains, l'infection lentivirale peut être évolutive, à condition que l'animal soit infecté tôt dans la vie et que sa survie soit longue.

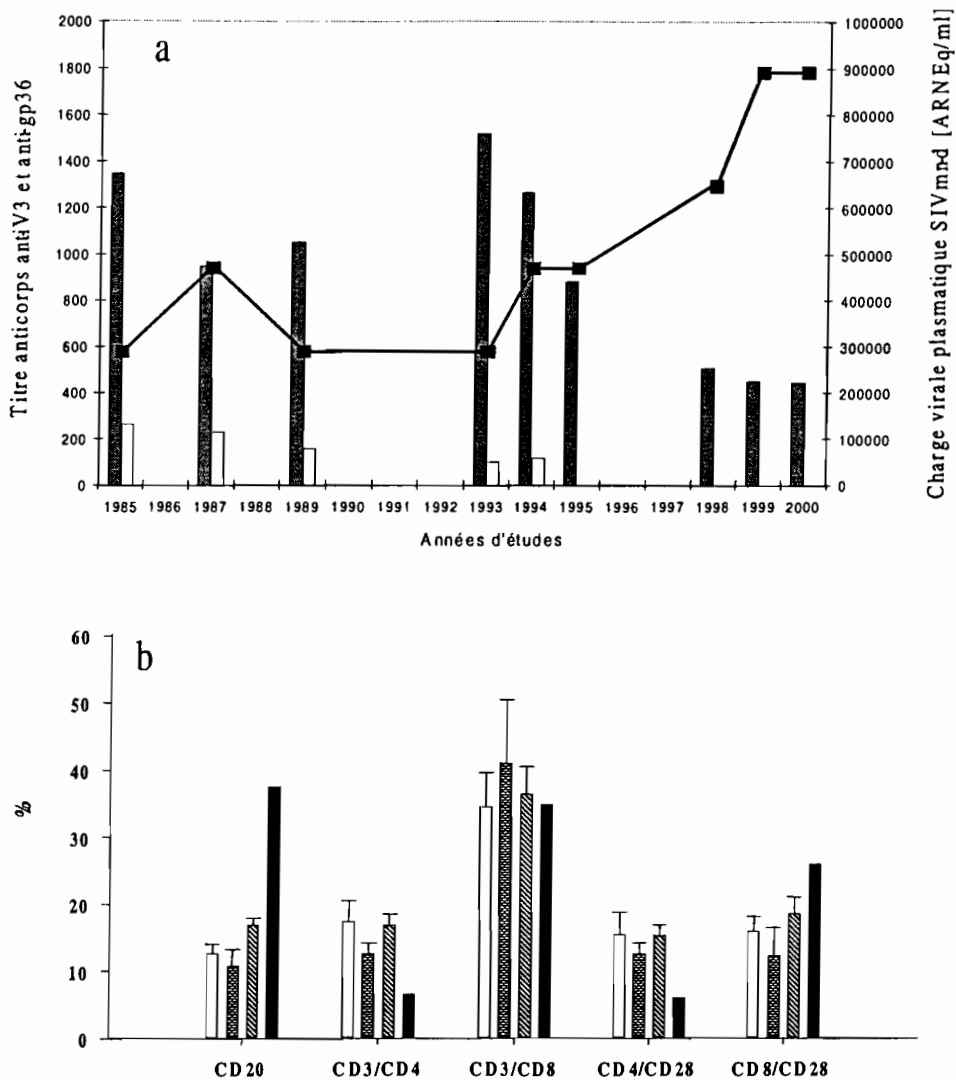


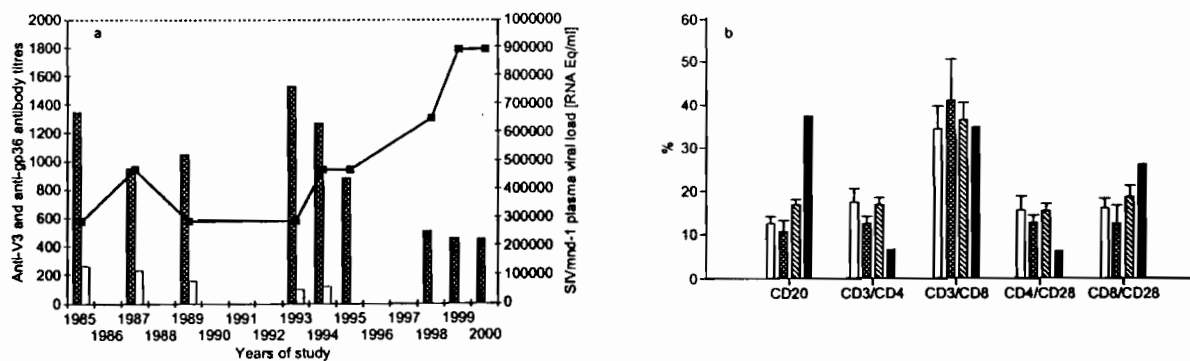
Figure 24: a. Evolution de la charge virale (■) et du titre anticorps anti-V3 (□) et anti-gp36 (■) chez la mandrill F17 infectés par SIVmnd-1. b. Comparaison des différentes sous population de lymphocytes dans le sang de la mandrill F17 infectée par SIVmnd-1 depuis 18 ans (■), ages groupés de mandrills non infectés (n=5, moy. Age=20ans, ▨), jeunes mandrills non infectés (n=6, moy. Age=9 ans, □), et mandrills chroniquement infectés par SIVmnd-1 (n=6, moy. Age=8,5 ans, ▩). Les bas niveaux de CD4+ enregistrés pour F17 ont été associés avec une augmentation significative ( $p < 0,005$ ) des cellules CD20<sup>+</sup> et des cellules CD8/CD28.



### Chronic SIV infection ultimately causes immunodeficiency in African non-human primates

The evolution of HIV infection towards AIDS is relatively constant and immanent, except in a small group of long-term non-progressors, in whom the virus-host equilibrium generates a different pattern of chronic infection. Conversely, African monkeys, the natural reservoir of SIV [1], appear to have developed effective control mechanisms and have already reached a dynamic equilibrium with their lentiviruses, allowing long-term infection without disease [2–6]. We present a case of natural lentiviral infection in *Mandrillus sphinx*, which has developed immunodeficiency after 18 years of follow-up.

A female mandrill (F17) kept in the semi-free ranging Centre International de Recherches Médicales colony from 1983 was diagnosed as SIVmnd-1 infected in 1988 [7], its infecting virus (SIVmnd-1 prototype strain GB1) being the first ever isolated from a mandrill. Retrospective testing showed that she had been infected before arriving at Centre International de Recherches Médicales. F17 died in July 2000 at the age of approximately 20 years. Unfortunately, the body could not be recovered from the enclosure, thus precluding the possibility of an autopsy. However, the mandrill was in apparent good health in the days



**Fig. 1.** Chronic SIVmnd-1 infection caused immunodeficiency in a *Mandrillus sphinx* after 18 years of follow-up. (a) Virological follow-up during 15 years revealed a significant ( $> 0.5$  log) increase in viral load (line) and a reduction of both anti-gp36 (grey columns) and anti-V3 (white columns) antibody titres. (b) Comparison of different lymphocyte subsets in the peripheral blood of mandrill F17 infected by SIVmnd-1 for 18 years (■), aged-matched uninfected mandrills ( $n = 5$ , mean age 20 years, ▨), young uninfected mandrills ( $n = 6$ , mean age 9 years, □) and chronically SIVmnd-1-infected mandrills ( $n = 6$ , mean age 8.5 years, ▩). The low levels of CD4 cell counts recorded for F17 were associated with significant ( $P < 0.005$ ) increases of CD20<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> cells.

preceding her demise. Sequential plasma samples collected since 1985 were tested using a limiting dilution reverse transcriptase-polymerase chain reaction for a semiquantitative measurement of viral load (R. Onanga, C. Kornfeld, I. Pandrea, *et al.*, in preparation). A significant increase in viral loads ( $> 0.5$  log) was observed during the follow-up (Fig. 1a), and was paralleled by a significant decrease in both anti-gp36 and anti-V3 antibody titres, a decrease of CD4 cell counts from 19% in 1995 to 6.6% in 2000 and by weight loss. Immunophenotypic analyses also revealed a significant increase in CD20<sup>+</sup> and CD8/CD28<sup>+</sup> counts for F17 when compared with aged-matched uninfected and young chronically infected and uninfected mandrills from the same colony, suggesting hypergammaglobulinaemia and an increased turnover of CD8 cells (Fig. 1b), both indicative of AIDS. At day 10 of the first passage of SIVmnd-GB1 strain to an uninfected mandrill during an experimental primary infection protocol, the co-receptors used by GB1 were CCR-5 and Bonzo.

Another mandrill was reported to have died in San Diego at the age of 18 years, with clinical conditions highly suggestive of AIDS [8]. This mandrill was infected by SIVmnd-2. Although the two mandrills were infected by different SIVmnd types, both appear to have developed immunodeficiency. This strongly suggests that monkeys infected with SIV in their early life and having a long enough lifespan can develop AIDS.

An age-dependent CD4 cell depletion was reported in sooty mangabeys, thus raising the question of whether the decrease in CD4 cells is an appropriate marker of the evolution of apathogenic SIV infections [9]. However, the CD4 cell depletion in F17 was associated with a constant increase in viral load, contrasting with SIVsm-infected sooty mangabeys in which the CD4 depletion corresponds with a significant decrease in viral load [9].

Data presented here are confirmed by the ability of heterologous lentiviruses to be pathogenic even in African primate hosts, as has already been shown for both HIV-1 and HIV-2, which were reported to be pathogenic in chimpanzees and baboons, respectively [10,11]. Although SIVmnd-1 originated by cross-species transmission, different studies suggest that it circulates widely in the wild [8] and is adapted to its mandrill host (R. Onanga, C. Kornfeld, I. Pandrea I, *et al.*, in preparation), so the immunodeficiency of F17 seems to be related to a long evolution of a chronic infection rather than to infection with a cross-transmitted virus.

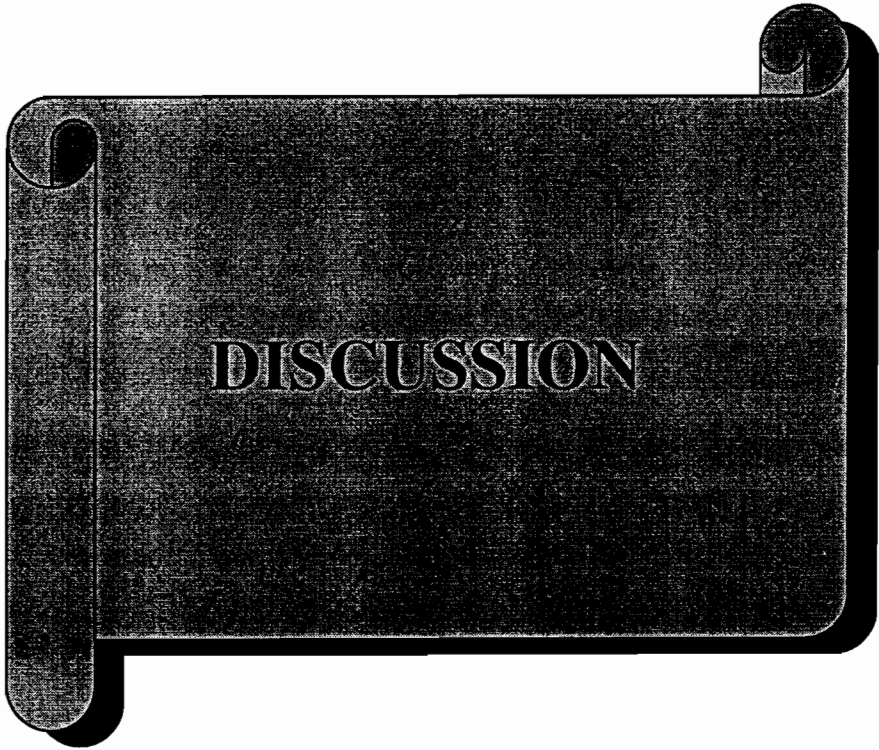
In conclusion, our report suggests that despite having a very long incubation period exceeding the normal lifespan of wild primates, SIV infection in African monkeys may be pathogenic. These results are in agreement with all other available data for lentivirus infections in mammals, which are always pathogenic in their respective hosts [12]. The main goal in the management of HIV infection has been the containment of infection rather than virus eradication. Our report shows that the study of lentiviral infection in African primates will provide valuable insights, meeting this major objective of AIDS research.

**Ivona Pandrea<sup>a</sup>, Richard Onanga<sup>a</sup>, Pierre Rouquet<sup>b</sup>, Olivier Bourry<sup>b</sup>, Paul Ngari<sup>a</sup>, E. Jean Wickings<sup>c</sup>, Pierre Roques<sup>a</sup> and Cristian Apetrei<sup>a</sup>,** <sup>a</sup>Laboratoire de Rétrovirologie, <sup>b</sup>Centre de Primatologie and <sup>c</sup>UGENET, Centre International de Recherches Médicales, Franceville, Gabon.

Received: 13 July 2001; accepted: 17 July 2001.

## References

- Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000, 287: 607-614.
- Diop OM, Gueye A, Dias-Tavares M, *et al.* High levels of viral replication during primary simian immunodeficiency virus SIVagm infection are rapidly and strongly controlled in African green monkeys. *J Virol* 2000, 74: 7538-7547.
- Chakrabarti LA, Lewin SR, Zhang L, *et al.* Normal T-cell turnover in sooty mangabeys harboring active simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2000, 74: 1209-1223.
- Goldstein S, Ourmanov I, Brown CR, *et al.* Wide range of viral load in healthy African green monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus. *J Virol* 2000, 74: 11744-11753.
- Broussard SR, Staprans SI, White R, *et al.* Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J Virol* 2001, 75: 2262-2275.
- Norley S, Beer B, Holzammer S, zur Megede J, Kurth R. Why are the natural hosts of SIV resistant to AIDS? *Immunol Lett* 1999, 66: 47-52.
- Tsujimoto H, Cooper RW, Kodama T, *et al.* Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill. *Nature* 1989, 341: 539-541.
- Souquière S, Bibollet-Ruche F, Robertson DL, *et al.* Wild *Mandrillus sphinx* are carriers of two types of lentiviruses. *J Virol* 2001, 75: 7086-7096.
- Chakrabarti LA, Lewin SR, Zhang L, *et al.* Age-dependent changes in T cell homeostasis and SIV load in sooty mangabeys. *J Med Primatol* 2000, 29: 158-165.
- Barnett SW, Murthy KK, Herndier BG, Levy JA. An AIDS-like condition induced in baboons by HIV-2. *Science* 1994, 266: 642-646.
- Novembre FJ, Saucier JM, Anderson DC, *et al.* Development of AIDS in a chimpanzee infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1997, 71: 4086-4091.
- Miller RJ, Cairns JS, Bridges S, Sarver N. Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J Virol* 2000, 74: 7187-7195.



DISCUSSION

## **DISCUSSION**

### **Le SIVmnd-1 chez le mandrill constitue un modèle pour les études des facteurs de résistance au SIDA**

#### **Le SIVmnd-1 se réplique activement chez son hôte sans le rendre malade**

Un certain nombre d'études ont montré que les infections SIV chez leur hôte naturel sont asymptomatiques et ont suggéré que la compréhension de ce phénomène pouvait améliorer la connaissance de la pathogénèse lentivirale (68; 187; 490; 491). Toutefois, les événements précoces de l'infection non pathogène ont été peu étudiés et seulement dans le modèle de l'infection SIVagm.sab chez les singes verts (68). Nous décrivons la primo-infection SIVmnd-1 chez le mandrill.

Notre étude s'intéresse à la dynamique de la charge virale durant la primo-infection chez les mandrills, afin de les comparer aux résultats obtenus dans le modèle d'infection non pathogène chez le singe vert (SIVagm) (68) et au modèle d'infection pathogène du macaque (SIVmac) (413; 746; 747).

Pour notre modèle, nous avons choisi d'utiliser du plasma de singes infectés comme source de virus comme cela a été fait par différentes équipes (68; 397; 445; 454; 746). Les profils de réplication chez les mandrills, mesurés par le nombre de copies d'ARN, par l'activité de la RT ou de l'antigénémie p24, ont été similaires pour chaque animal en dépit de la variabilité inhérente à la sensibilité des tests utilisés. La charge virale mesurée par le nombre de copies d'ARN par ml s'élève jusqu'à des très hauts niveaux ( $10^6$  à  $2 \times 10^8$  copies d'ARN par ml), similaires à ceux rencontrés dans les infections pathogènes chez les humains et les primates non humains. Le pic de réplication virale détecté autour du jour 10 après infection est suivi par une diminution rapide et significative de la charge virale. Finalement, les dynamiques des charges virales et les niveaux de réplifications ont été remarquablement similaires entre individus distincts, aussi bien pour les mandrills incluses dans notre groupe d'étude que ce qui est décrit pour les singes verts (68). Il est remarquable que la détection par le kit p24 (dirigé contre le VIH-1) soit plus sensible que le kit p27 généralement utilisé pour la détection en général d'antigènes de singes, cela peut être rapproché l'étude phylogénétique qui montre que SIVmnd-1, pour le gène *gag* est plus proche du VIH-1 que le VIH-2 (15). La quantité d'antigène core détecté par le test VIH-1 p24 Ag était plus faible par rapport aux niveaux de

p27 rapportés dans l'infection du macaque par un SIVmac pathogène (413; 746; 747), le kit p-27 étant spécifique pour le SIVmac/VIH-2/SIVsm. En effet, les virémies semblent élevées quand elles sont mesurées par les autres méthodes. De plus, les profils de cinétique avec le kit Ag-p24 chez les mandrills dans le plasma sont complètement superposables à celles obtenues en mesurant l'activité de la RT et la charge virale ARN dans le sang.

Ces taux élevés durant la primo-infection chez les mandrills suggèrent que le SIVmnd-1 est bien adapté aux mandrills.

Pendant la phase aiguë et la phase chronique de l'infection (étudiée ici entre le 35<sup>ème</sup> et le 360<sup>ème</sup> jour) les charges virales sont considérablement élevées (entre  $10^5$  et  $2 \times 10^8$  copies d'ARN par ml). Elles ont été constantes chez un même animal, quoique variable entre les différents animaux testés. Dans les infections VIH-1 et SIVmac, un nombre de copies ARN de  $10^5$ - $10^7$  est associé à un risque plus élevé de progression vers la maladie (300; 385). Aussi, l'absence de pathologie chez les mandrills infectés par SIVmnd-1 semble paradoxale au regard de cette charge virale élevée. Des charges virales plasmatiques similaires ont été observées et n'ont pas plus d'effet pathogène chez les singes verts infectés par SIVagm naturellement ou expérimentalement (68; 490; 491) pour les mangabés infectés par SIVsm naturellement (187; 188). Cette réplication virale évoque un mécanisme similaire de protection chez les différentes espèces de singes africains contre la progression vers la maladie. Cette hypothèse est soutenue par des études menées au cours d'infections naturelles et expérimentales par SIV chez les trois espèces, dont les profils de réplication pendant la primo-infection sont remarquablement semblables entre SIVmnd-1 et SIVagm.sab, en particulier le profil de réplication en primo-infection du singe Sabeus par SIVagm.sab (68).

Notre étude confirme que les mandrills, comme les singes verts, sont en équilibre non pathogène avec leur virus et que les hauts niveaux de réplication observés pendant l'infection VIH, ne sont pas les seuls facteurs responsables de la déplétion progressive du nombre de cellules CD4<sup>+</sup> et du SIDA.

## **L'infection SIVmnd-1 présente une légère baisse transitoire du taux des CD4<sup>+</sup> corrélé avec le pic de la charge virale au cours de la primo-infection**

Nous présentons pour la première fois une cinétique du nombre de cellules CD4<sup>+</sup> durant la primo-infection.

Bien que nous n'ayons pas observé de baisse du nombre de cellules CD4<sup>+</sup> en périphérie pendant la phase aiguë de l'infection, aussi forte que celle observée chez les macaques et les humains, une légère réduction des cellules CD4<sup>+</sup>, associée au pic de réplication virale, a été enregistrée. Cette réduction est plus nette si l'on prend le ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. La réduction moyenne du ratio pendant la phase aiguë de l'infection était significative et cela était dû à la réduction du taux de CD4<sup>+</sup>. Cette réduction peut être due à l'apoptose induite par le virus ou une séquestration dans les ganglions ou encore par émergence des lymphocytes cytotoxiques (CTLs) lors de l'infection (600), (511; 748; 749). Cependant, dans les ganglions des mandrills, on observe une chute du pourcentage de CD4<sup>+</sup> générant un changement plus important dans le ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> que dans le sang périphérique. Ces informations suggèrent une implication directe de la réplication virale sur le système immunitaire effecteur. La chute des CD4<sup>+</sup> est toutefois modérée et transitoire, et les valeurs reviennent à la normale 60 jours après infection. La dynamique des cellules CD4<sup>+</sup> prise toute seule n'explique pas les changements dans la charge virale. Aussi, l'état d'activation de ces cellules ne semble montrer aucun contrôle de la réplication virale chez les mandrills infectés.

Le contrôle de la virémie semble ne pas être associé particulièrement avec une vigoureuse réponse immune. En effet, nous n'avons pas observé de signes de fièvre ou d'adénopathies périphériques chez les mandrills, ou une augmentation significative des lymphocytes, évocateurs d'une vigoureuse activation du système immunitaire. Les nombres de CD4<sup>+</sup> et le ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> retournent tous deux à des valeurs normales 60 jours après infection, ce qui montre que durant la primo-infection non pathogène chez les primates non humains l'équilibre virus hôte est rapidement atteint. En effet, la virémie reste élevée et se stabilise à un haut niveau dès le jour 60 et demeure stable durant des années comme nous l'avons démontré dans notre étude (article en préparation sur les charges chroniques)

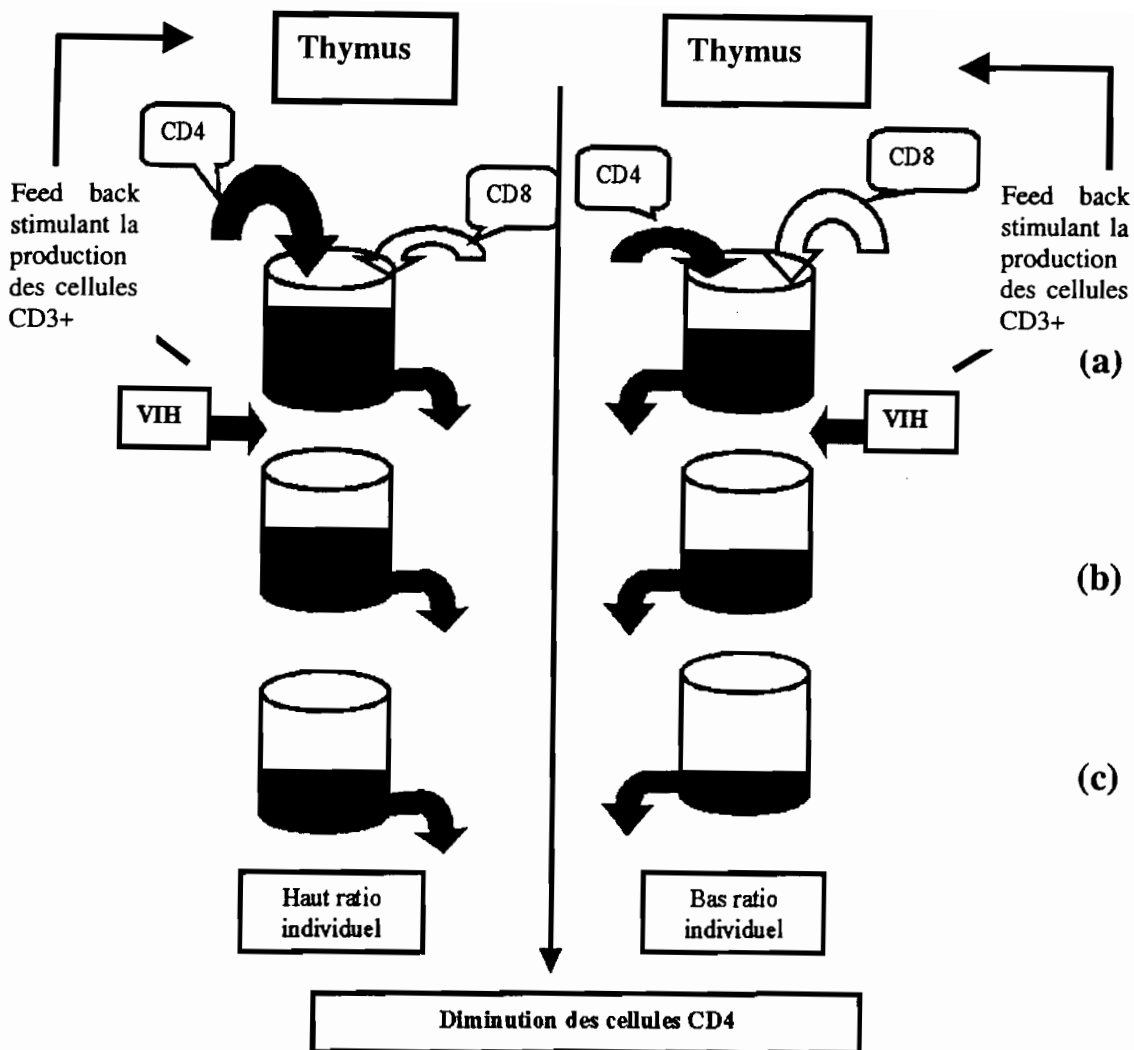
La dynamique du SIVmnd-1 dans le sang peut être reliée au nombre de cellules cibles disponibles chez les mandrills. Dans l'infection pathogène, un renouvellement rapide à la fois du virus et des cellules CD4<sup>+</sup> T maintient les niveaux de VIH et SIVmac dans le sang (750), (523), (751), (402; 403; 528). La dynamique de la pathogénèse dans les modèles pathogènes

est ainsi couramment expliquée par le mécanisme suivant: l'activation de la réplication du VIH induit une accélération de la destruction des cellules CD4<sup>+</sup> (523; 750) conduisant à la sur-utilisation des réserves de lymphocytes, entraînant par la suite un épuisement du système immunitaire. Des destructions directes de cellules peuvent être accompagnées par d'autres effets délétères comme par exemple une propension des cellules non infectées à induire l'apoptose, la destruction de l'architecture des tissus lymphoïdes et la suppression des cellules précurseurs produites par la moelle osseuse et le thymus (405; 544; 752; 753). Toutefois, ce "open tap-open drain" (Figure 23) modèle de la pathogenèse VIH n'est pas totalement en adéquation avec les résultats des infections SIV chez les singes d'Afrique. Les analyses de la dynamique des cellules périphériques ont montré qu'il n'y avait pas de diminution significative des CD4<sup>+</sup>, encore moins une augmentation des cellules CD8<sup>+</sup> chez les mandrills infectés par SIVmnd-1 en fonction de la réplication. Des analyses plus avancées pourraient être réalisées afin de savoir si la tendance au déclin périphérique des CD4<sup>+</sup> était observée chez les mandrills chroniquement infectés. La baisse des CD4<sup>+</sup> chez les mangabés âgés s'accompagne également d'une baisse de la charge virale (496), alors que les études menées chez les mandrills âgés montrent une baisse des CD4<sup>+</sup> associée à une augmentation de la charge virale. Toutefois, les conditions du décès de la mandrill F17, n'ont pas été associées à un SIDA.

Il a été observé à la fois chez les singes verts infectés par SIVagm et les mangabés infectés par SIVsm, une légère baisse modérée du nombre de cellules CD4<sup>+</sup> périphériques au-dessous de ceux des animaux non infectés (754), de l'ordre de 35% (P<0,0086) (538). Cependant, ces diminutions modérées ne semblent pas compromettre le statut clinique des animaux (491).

L'absence d'une augmentation progressive des cellules CD8 chez les mandrills et de fièvre ou d'adénopathies sont en faveur de cette hypothèse. Nos études sont en accord avec les informations rapportées chez les autres espèces de singes d'Afrique. Chez les mangabés, une espèce appartenant à la super famille des *Cercocèbes* (voir chapitre III,§1), une régénération normale des cellules T a été rapportée en dépit d'une infection SIVsm active (538). Aussi, pour cette espèce, il a été rapporté une résistance relative dans le développement de l'anergie (755). Ces deux éléments pourraient expliquer le maintien fonctionnel au long terme du système immunitaire chez leur hôte.

L'activité NK joue un rôle important pour l'immunité innée, notamment comme première ligne de défense contre les infections virales. Elles ont une activité cytotoxique ne nécessitant



**Figure 20:** représentation schématique du « *open tap open* », suggérant que suivant l'infection VIH, les individus présentant un haut ratio entre les cellules T CD4<sup>+</sup> (en noir) et les cellules T CD8<sup>+</sup> (en gris clair) compensent mieux la perte en cellules T CD4<sup>+</sup>, comparé aux individus avec un ratio bas. (a) Chez les individus en bonne santé, le taux des cellules T CD4<sup>+</sup> est en équilibre dans les deux ratio grâce à un mécanisme homéostatique régulant le taux des CD3<sup>+</sup>. (b) Suivant l'infection VIH, l'augmentation de la perte des cellules T CD4<sup>+</sup> résulte d'une augmentation de la production des cellules T CD3<sup>+</sup>, les individus à ratio élevé produisent des cellules T avec une balance en faveur des cellules T CD4<sup>+</sup>, le déclin de cette population est lent et moins prononcé que chez les individus séropositifs ayant un ratio bas qui préférentiellement produisent les cellules CD8<sup>+</sup>, en réponse à la perte des CD3<sup>+</sup>, (c) Après plusieurs années, le taux de CD3<sup>+</sup> est trop faible chez les individus à faible ratio pour maintenir la perte des CD4<sup>+</sup>, ce qui aboutit à une lymphopénie CD4<sup>+</sup> sévère, alors que ceux à fort ratio résistent à l'infection grâce au pool important en cellules CD4<sup>+</sup>.



pas d'immunisation préalable et facilement quantifiable. Dans la phase précoce de l'infection VIH, il n'a pas été observé une diminution du nombre absolu ou de pourcentage des cellules NK (CD16<sup>+</sup>) (666). Au fur et à mesure de la progression de la maladie, le nombre de cellules CD16<sup>+</sup> (632) ou CD56<sup>+</sup> diminue (666) et cela peut contribuer à la diminution de l'activité NK. Comme chez les humains, les macaques infectés par SIV ont montré une activité NK significative beaucoup plus faible que chez les macaques non infectés (498; 633). Ces défauts ont été observés aussi précocement que deux mois après post-infection. En contraste, l'activité NK chez les sooty mangabey infectés par SIV n'est pas différente de celle des mangabés non infectés (498). De même, l'infection expérimentale par VIH-1 chez les chimpanzées n'a pas d'impact négatif sur l'activité NK (634; 650). Un chimpanzé infecté naturellement par un VIH-1 like (SIVcpz) a été bien étudié (650) et l'activité NK chez cet animal a été trouvée significativement très élevée par rapport aux animaux contrôles. Ce qui est intéressant, est que l'activité NK de cet animal et le nombre de cellules NK fluctuait au cours du temps et était inversement corrélé au titre viral dans le sang périphérique (650). Malgré une activité cytotoxique NK élevée chez des mandrills sains par rapport aux autres espèces, il semble que ce dernier n'aie pas d'effet au cours de l'infection, car il n'a pas été observé d'expansion du compartiment CD8<sup>+</sup>, témoin d'une activité cellulaire cytotoxique. Cependant des études fonctionnelles restent à effectuer.

Nos résultats confirment que la charge virale seule n'est pas responsable de la non pathogénicité de l'infection lentivirale chez les singes d'Afrique. Des investigations supplémentaires qui sont en cours, sont nécessaires afin de comprendre le mécanisme particulier de l'équilibre virus hôte dans ce modèle. La plupart des hypothèses valables expliquant ces études est la susceptibilité d'activation des cellules de mandrills peuvent être différents de celles observées à la fois chez l'humain et le macaque.

### **Le modèle mandrill peut être un modèle intermédiaire entre les modèles pathogènes et non pathogènes**

Un fort taux de séropositivité a été observé au cours de la transmission mère-enfant (27.8 %) du SIVmnd-1 au sein de la colonie des mandrills au CIRMF. Cependant, il n'y a pas eu de transmission sexuelle des deux virus SIVmnd-1 et SIVmnd-2 au sein de la colonie (70). Ces deux voies, transmission sexuelle et verticale ont été observées dans la transmission des SIV (157; 158.; 159; 756), néanmoins la transmission horizontale au cours des combats entre

animaux constitue la voie majeure par laquelle le virus est disséminé (161; 162). Il n'a été observé aucun signe clinique associé au SIDA chez les mandrills infectés par SIVmnd depuis plus de 10 ans, sauf une tendance à la baisse des cellules CD4<sup>+</sup> (70). Cette baisse des cellules CD4<sup>+</sup> a été remarquée chez un des mandrills âgés et infectés par SIVmnd-1 dans notre étude, tout comme chez les mangabés (496). Elle limiterait ainsi le nombre de cellules cibles et pourrait expliquer la non pathogénicité de l'infection chez les singes d'Afrique.

La transmission inter espèce peut jouer un rôle dans l'augmentation de la pathogénicité chez un hôte nouvellement infecté, tel qu'il a été observé chez l'homme et le macaque (209; 406; 757-759). Toutefois, les autres cas de transmission inter espèce entre singe d'Afrique n'ont été associés à aucune pathologie reliée au SIDA. Ainsi, le virus SIVagm a été transmis aux babouins jaune et chamchca (261; 262) et chez des patas sauvages (263) sans induire de près ou de loin une immunodéficience. Inversement, l'infection expérimentale des singes macaques (rhésus, cynomolgus indien ou chinois) par les SIVsm du sooty mangabey, le SIVagm du singe vert sabeus ou du SIVlhoest du singe l'hoesti induisent un SIDA entre 6 mois à deux ans après l'infection (176; 179; 180; 184; 393; 428). Bien que les mandrills soient le réservoir naturel du SIVmnd-1, comme il a été montré par la haute prévalence de ce virus chez les mandrills sauvages (15) des évidences récentes suggèrent que le SIVmnd-1 puisse avoir été transmis depuis longtemps à partir d'un virus d'un singe du super groupe l'hoesti vers le mandrill. Et, la présente étude, n'établissant pas une corrélation clinique de l'infection SIVmnd-1, mais un caractère pathogène, montre que le virus se serait adapté à son hôte.

Cet équilibre virus hôte rapporté pour les singes d'Afrique, n'est pas un phénomène absolu mais plutôt une délicate balance dépendante de plusieurs facteurs, un de ceux étant représenté par l'adaptation virale pour le VIH-1 et VIH-2, qui se sont montrés non pathogènes chez les chimpanzés, les macaques et les babouins respectivement (423; 424; #2215; 451). Après l'adaptation chez les macaques, le SIVsm s'est montré également pathogène chez son hôte naturel, le sooty mangabey (176).

Cette étude constitue une approche préliminaire dans l'identification des facteurs responsables de la non pathogénicité dans le modèle mandrill infecté par SIVmnd-1 durant la primo-infection. Elle a permis de montrer que l'infection SIVmnd-1 chez le mandrill présente des similitudes avec les autres modèles non pathogènes et l'infection VIH-1 non progressives.



CONCLUSIONS  
ET  
PERSPECTIVES

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous nous sommes proposés de mettre en place un nouveau modèle non pathogène pour l'infection VIH. Nous avons choisi comme modèle non pathogène, l'infection SIVmnd chez le mandrill. En effet, le CIRMF héberge au centre de primatologie une colonie de mandrill établi depuis plus de 15 ans. Aucun signes de SIDA n'a été observé depuis la création de cette colonie. La compréhension des facteurs pouvant expliquer la non pathogénicité de l'infection lentivirale SIVmnd-1 chez le mandrill, nous a conduit aux buts suivants :

### 1. Déterminer les paramètres biologiques et immunologiques du mandrill.

Cette étude a eu pour but de mettre en place les outils permettant de caractériser le système immunitaire du mandrill, et de le comparer à d'autres espèces, en particulier l'homme. Pour cela, nous avons effectué, des analyses biologiques, testé des anticorps humains sur du sang de primates afin de distinguer les différentes populations lymphocytaires, et enfin, comparé sur le plan fonctionnel le système immunitaire de différentes espèces. Ces résultats ont montré que le mandrill était une espèce présentant des similarités biologiques avec les autres espèces de singes d'Afrique et l'homme en particulier. Nous avons montré que la majorité des anticorps monoclonaux utilisées pour reconnaître les différents groupes cellulaires de l'immunité chez l'homme peuvent être utilisés chez plusieurs espèces de singes d'Afrique en particulier chez le mandrill. Cependant, certains épitopes sont mal reconnus et nous avons dû sélectionner des anticorps spécifiques des cellules immunitaires simiennes. Nous avons aussi mis au point les tests de prolifération cellulaires sur les PBMC des mandrills et caractérisé l'activité NK dans cette espèce.

### 2. Effectuer la caractérisation moléculaire et phénotypique d'un nouveau SIVmnd.

Sur de l'ADN extrait des PBMC du mandrill 14 nous avons effectué des amplifications suivies de séquençages direct afin de comparer les séquences obtenus avec celle du SIVGB1 déjà décrites et celles des autres SIV. Nous avons montré que l'infection SIVmnd chez le mandrill résulte de la circulation de deux types de SIVmnd, dont SIVmnd-1 et SIVmnd-2. Ces deux virus présentent des caractères virologiques différents ; le SIVmnd-1 est plus détectable par le kit antigène p24 qu'avec le kit p27, alors que le SIVmnd-2, ne l'est que par le kit p27. D'ailleurs ces deux virus sont proches phylogénétiquement dans le gène *env*, mais sont distant dans les gènes *gag*, *pol* et *vif*. Le SIVmnd-2 est un virus recombinant du SIVmnd-1 et du mangabé à crête rouge. Une différence de charge virale a été trouvée chez les mandrills infectés naturellement par les deux type de SIVmnd, le SIVmnd-2 possède 2 Log de dilution en moins par rapport au SIVmnd-1. En outre il a été démontré que le

SIVmnd-2 infectent les lignées humaines et simiennes à l'exception des lignées cellulaires myélomonocytaires U937.

3. Etudier les paramètres virologiques lors de la primo-infection et la phase chronique de *M. sphinx* infecté par SIVmnd-1.

Cette étape a nécessité la mise en place d'une méthode quantitative RT-PCR dans le plasma, afin de mesurer l'évolution du SIVmnd-1 au cours de l'infection. La cinétique de la charge virale est identique chez les quatre animaux que nous avons infecté, avec des pics de virémies observé entre J7 et J10. La primo-infection SIVmnd-1 est caractérisée par une forte réplication virale ( $2 \times 10^6$ - $2 \times 10^9$  copies/ml), vigoureusement contrôlée après le pic viral, mais demeurant élevée ( $2 \times 10^5$  copies/ml) et stable durant la phase chronique. Cette charge virale est comparable celle observée chez le macaque infecté par SIVmac et les singes verts sabelus et vervet infectés par leur virus respectifs SIVagm.Sab et SIVagm.Ver. Les isolements en culture du SIVmnd-1 effectués aux phases aiguë et chronique de l'infection sont corrélées avec la cinétique de la charge virale plasmatique au cours de l'infection. Enfin, nous avons démontré que le SIVmnd-1 utilisait pour rentrer dans les cellules en priorité CCR5, puis Bob et Bonzo au cours de la primo-infection

4. Etudier la réponse immune, humorale et cellulaire, et la corrélér à la dynamique de la charge virale en phase aiguë et chronique de l'infection.

En dehors de la réaction immune lié au plasma, ce qui explique la grande variabilité observée chez tous les animaux au tout début de l'infection (témoins et positifs), la réponse immunitaire est caractérisée par ; (i) une baisse transitoire des  $CD3/CD4^+$ , suivie d'une faible augmentation transitoire des  $CD8^+/CD28$ , (ii) une apparition des anticorps anti-gp36 et anti-V3, 28 jours après infection, (iv) et enfin une absence de corrélation entre l'évolution de la charge virale et la réponse immune.

Nos données montrent que la primo-infection SIVmnd-1 chez les mandrills est associée à des modifications mineurs et transitoires du système immunitaire chez les mandrills, et corroborent les données épidémiologiques qui montrent aucun signes cliniques ni biologiques dans l'infection naturelle SIVmnd-1 chez les mandrills. Ces données suggèrent, d'un côté, que le virus s'est adapté à l'hôte et conduit à une infection stable non pathogène (la cross transmission étant ancienne), de l'autre, que les singes d'Afrique sont résistant à la suppression immune et/ou à l'activation anormale induite par les lentivirus. La pathogénèse de l'infection lentivirale chez les singes d'Afrique pourrait être ainsi recherchée afin d'établir les facteurs associés, l'un à l'adaptation virale chez un nouvel hôte, l'autre à la résistance à l'infection lentivirale. Ces études pourraient par exemple expliquer les mécanismes de

reconstitution immunitaire observée chez les patients VIH+ sous HAART et non répondant virologiquement ou le maintient des CD4 chez les progressseurs lents.

En perspective, le mandrill pourrait être un modèle pour tester les vaccinations avec des virus atténués. En effet, on peut faire l'analogie avec les humains infectés par deux virus possédant des pouvoirs pathogènes potentiellement différents, et les mandrills qui sont naturellement infectés par deux SIVmnd d'origine différente. Ces études supposent l'extension de notre travail à l'analyse de la primo-infection des mandrills avec le SIVmnd-2, ainsi qu' à la caractérisation de la réponse immune spécifique au deux virus.

L'utilisation du mandrill comme modèle de la transmission mère-enfant des lentivirus constitue aussi une approche permettant de mieux caractériser les deux types viraux dans la pathogénèse du SIDA, et pourrait donner des informations complémentaires sur la transmission mère-enfant.

Les modèles non pathogènes sont très précieux dans l'étude de la résistance au SIDA suite à l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne. En effet, cette résistance semble être liée à l'hôte, ceci à cause du contrôle précoce observé en phase aiguë et du maintient en équilibre avec une charge virale élevée durant des années. Peu d'études expérimentales ont été menées afin de déterminer avec précision la nature de cette résistance et d'identifier la combinaison des facteurs responsables de la progression vers la maladie comme cela s'observe dans l'infection VIH et le modèle SIVmac.

ANNEXES

# ANNEXES

## REACTIFS ET TAMPONS

### 1- Culture cellulaire et détection virales

#### \*Réactifs

- Ficoll-paque (Pharmacia Biotech)
- RPMI 1640 (Bio\*Wittaker)
- DMEM : Dubelcco's Modified Eagle's Medium (SIGMA)
- SVF : sérum de veau foetal (Gibco Life Technologies) décomplémenté 30mn à 56°C
- IL2 : interleukine 2 (200U/ml, Biotest)
- PSN : Pénicilline-Streptomycine-Néomycine X 100 (20ml, Gibco BRL)
- ConA: Conavaline A (0,4mg, Poly Labo) concentration finale d'utilisation de 10µg/ml
- SEA : streptococcal exotoxin A (polylabo) concentration finale d'utilisation de 5µg/ml
- PHA-L concentration finale d'utilisation de 2µg/ml (SIGMA)
- PHA-p concentration finale d'utilisation de 2µg/ml (DIFCO)
- L-Glutamine X 100(200mM, 100ml, Gibco BRL)
- Bleu Trypan 0,4% (SIGMA)
- Bleu Turk's (SIGMA)
- DMSO (SIGMA)
- Anticorps IOT8a (Becton Dickinson)
- Fixateur de cellules anti-IOT8a (Dynabeads, M 450 sheep ant-mouse IgG)
- Geneticin (G418) (SIGMA), 100mg/ml, 1ml.
- Hygromycin B (Sigma) 50mg/ml , 1 ml.
- Puromycin (Sigma) 2mg/ml, 0,5ml.
- Trypsine-EDTA Solution 1X (SIGMA)

#### \*Milieux

- Milieu complet 10% (pour PBMC simiens): RPMI 1640 contenant; 10% de SVF, 1% de PSN, 1% L-Glutamine, 10 µl IL-2 .
- Milieu complet 20% (pour PBMC humains): RPMI 1640 contenant;20% de SVF, 1% de PSN, 1% L-Glutamine,10µl IL-2
- Milieu normal 10% (pour Lignées ou PBMC simiens): RPMI 1640 contenant;10% de SVF, 1% de PSN, 1% L-Glutamine.
- Milieu normal 20% (pour PBMC humains): RPMI 1640 contenant;10% de SVF, 1% de PSN, 1% L-Glutamine, 0,1% G418, 0,1% Hygomycine.
- Milieu de séparation des CD8 : RPMI 1640 contenant;5% de SVF.
- Milieux Parents Ghost : Medium-DMEM contenant 10% de SVF, 1% de PSN, 1% L-Glutamine.
- Milieux complet Ghost : Medium-DMEM contenant 10% de SVF, 1% de PSN, 1% L-Glutamine, 0,1% G418, 0,1% Hygomycine, 0,1% Puromycine.
- Milieu de base ou de décongélation: RPMI 1640 à 20% de SVF.
- Milieu de congélation: 90% de SVF, 10% DMSO.

### 2- Techniques de diagnostics sérologiques

#### \*ELISA:



- Genelavia Mixt VIH-I/VIH-II: coffret commercialisé par Sanofi Diagnostics Pasteur.
- Genscreen VIH1/2 : coffret commercialisé par Sanofi Diagnostics Pasteur.
- Peptides Gp 41 et V3

### Séquences des peptides SIVmndGB1

<b>V3 SIVmndGB1 : NRSVVSTPSATGLLFYHGLEPGKNLKKG</b>
<b>Gp41 SIVmndGB1 : TSLENYIKDQALLSQWGCSWAQVC</b>

#### \*Réactifs

Conjugué: anti human IgG Peroxydase Conjugate (SIGMA)  
 OPD tablets (SIGMA)  
 PBS 1X (Biomérieux)  
 NaCL 5M (SIGMA)  
 Tween 20 (SIGMA)  
 Tampon Bicarbonate (SIGMA)  
 SVNN (GIBCO)  
 SVF (Biowhittaker)  
 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (BOEHRING)

#### \* Solutions ET Tampons

Tampon Bicarbonate 50mM à PH 9,6 : 1 gélule dans 100 ml d'eau distillée  
 Tampon de saturation : PBS contenant 2% de SVNN  
 Tampon de dilution des échantillons :

180 ml NaCL 5M  
 100 ml de SVF  
 500 µl de Tween  
 720 ml de PBS

Tampon de lavage PBS à 0,5% de tween :

1 litre de PBS  
 5 ml de tween

Solution d'OPD :

1 comprimé d'OPD  
 1 comprimé d'urée  
 20 ml d'eau distillée  
 Solution d'arrêt : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N

#### \*Western blot:

- New Lav Blot VIH 2.2: coffret commercialisé par Genelabs Diagnostic.
- HTLV Blot 2.3 : coffret commercialisé par Genelabs Diagnostic.

### 3- Détection des antigènes viraux

- \*ELAVIA AG I Kit for the detection of VIH 1 Ag by enzyme immunoassay & Antigen VIH 1 etalon : Sanofi diagnostics Pasteur
- \*Kit de détection d'antigène viral P24 SIV: Coulter™ SIV core Antigen Assay
- \*Lenti-RT™ Trousse d'activité : Cavid Tech

### 4- Détermination des clusters de différenciation

- \*Aimant MPC6 (Dynal)
- \*Billes magnétiques M450 (Pan T) (Pan B) (Dynal)
- \*Isotype contrôle IgG1 (PE) (Becton Dickinson)
- \*Isotype contrôle IgG2a (FITC) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, Leu 3A, CD4 (PE) (FITC) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, CD34 (PE) (FITC) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, CD16 (PE) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, CD2 (FITC) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, OKT4 CD4 (PE) (FITC)
- \*Monoclonal antibody, CD3 (FITC) (Biosource)
- \*Monoclonal antibody, CD28 (PE) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, Leu 2A, CD8 (PE) (FITC) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, CD45RA (FITC) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, HLA-DR (FITC) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, CD45RO (FITC) (Becton Dickinson)
- \*Monoclonal antibody, CD56 (PE) (Immunotech)
- \*Monoclonal antibody, CD3 (FITC) (Immunotech)
- \*Monoclonal antibody, CD2 (FITC) (Immunotech)
- \*Monoclonal antibody, CD11a (FITC) (Immunotech)
- \*Monoclonal antibody, CD11b (FITC) (Immunotech)
- \*Monoclonal antibody, CD14 (FITC) (Immunotech)

### 5- Réactifs pour les tests cytotoxicité naturelle

- \*  $^{51}\text{Cr}$  (Amersham life)

### 6- Réactifs et solutions pour l'amplification génique

#### \*Réactifs et kits

- TRIS HCL PH8 (SIGMA)
- EDTA 250 mM (SIGMA)
- NaCl 20 mM (SIGMA)
- SDS 1 % (Quantum, Bioprobe)
- KCl
- MgCl<sub>2</sub>
- MgSO<sub>4</sub>
- Ethanol (SIGMA)
- Phénol (SIGMA)
- Chloroforme (SIGMA)
- Protéinase K
- Acétate de sodium (SIGMA)
- Quiagen plasmid Mini/Maxi Kit (Quiagen)

QIAamp viral RNA Mini Kit (Quiagen)  
 Kit PCR (Boehringer Mannheim)  
 HotStarTaq DANN Polymérase (Quiagen)  
 One Step RT-PCR (Quiagen)  
 MEGAscript kit (Ambion)  
 PCR purification kit (Quiagen)  
 TopoTA Cloning Kit (Invitrogen)  
 Chroma Spin-30 H<sub>2</sub>O DEPC Column (Clontech)  
 TBE 5X (SIGMA)  
 Brommure d'éthidium (SIGMA)  
 Agarose for routine (SIGMA)  
 PCR 2.1 topo (Invitrogen)  
 Bleu de charge (SIGMA)  
 Bactotryptone (DIFCO)  
 Bacto yeast levure extact (DIFCO)

### \*Solutions et Tampons

Tampon de lyse : NTE

TRIS HCL PH 8	10 mM	500 µl
EDTA	20 mM	4 ml EDTA 250 mM
NaCl	20 mM	200 ul NaCl 5 M
SDS	1 %	2,5 ml SDS 20 %
qsp	50ml	

Tampon de migration : 1X

TBE 5X	2%
H <sub>2</sub> O	

Gel d'agarose 2%

Agarose for routine	2%
TBE	1X

Milieu LB liquide

Bactotryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
qsp H <sub>2</sub> O	100ml

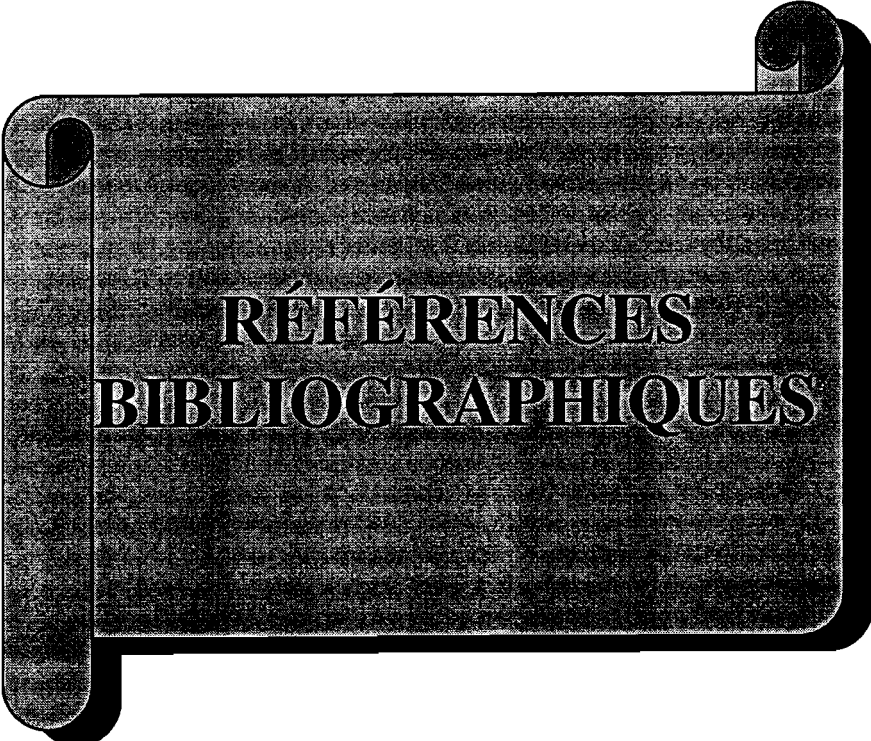
Milieu LB solide

Milieu LB liquide additionné de :

Gelose Pasteur 15g /l

Milieu SOC

Bactotryptone	2%
Extrait de levure	0,5%
NaCl	5g
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
KCl	10 mM
MgO <sub>4</sub>	10mM
Glucose	20 mM



RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler, B. C., Vezinet, B. F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599), 868-71.
2. Popovic, M., Sarnagadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224(4648), 497-500.
3. Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L., and Alizon, M. (1986). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324(6098), 691-5.
4. Benveniste, R. E., Raben, D., Hill, R. W., Knott, W. B., Drummond, J. E., Arthur, L. O., Jahrling, P. B., Morton, W. R., Henderson, L. E., and Heidecker, G. (1989). Molecular characterization and comparison of simian immunodeficiency virus isolates from macaques, mangabeys and african green monkeys. *J. Med. Primatol.* 18, 287-303.
5. Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., and Johnson, P. R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389-92.
6. Lowenstine, L., Pederson, N., Higgins, J., Pallis, K., Uyeda, A., Marx, P., Lerche, N., Munn, R., and Gardner, M. (1986). Seroepidemiologic survey of captive old-world primates for antibodies to human and simian retroviruses, and isolation of a lentivirus from sooty-mangabeys (*Cercocebus atys*). *Int. J. Cancer* 38, 563-574.
7. Otha, Y., Masuda, T., Tsujimoto, H., Ishikawa, K., Kodama, T., Morikawa, S., Nakai, M., Honjo, S., and Hayami, M. (1988). Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiological survey of the virus in various non-human primates. *Int. J. Cancer* 41(122-155).
8. Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326, 662-669.
9. Huet, T., Chenyier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., and Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature (London)* 345, 356-358.
10. Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40(1), 9-17.
11. Clewley, J. P., Barlow, K. L., Parry, J. V., and Lewis, J. (2001). *8th annual HIV dynamics and evolution meeting, Paris, France.*
12. Saragosti, S., Ekwalanga, M., Daza, M. C., Mende, M., and Shamara, K. B. (2001). *8th annual HIV dynamics and evolution meeting, Paris, France.*
13. Chakrabarti, L., Guyader, M., Alizon, M., Daniel, M. D., Desrosiers, R. C., Tiollais, P., and Sonigo, P. (1987). Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature (London)* 328, 543-547.
14. Georges-Courbot, M. C., Lu, C. Y., Makuwa, M., Telfer, P., Onanga, R., Dubreuil, G., Chen, Z., Smith, S. M., Georges, A., Gao, F., Hahn, B. H., and Marx, P. A. (1998). Natural infection of a household pet red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 72(1), 600-8.
15. Souquière, S., Bibollet-Ruche, F., Robertson, D. L., Makuwa, M., Apetrei, C., Onanga, R., Kornefeld, C., Plantier, J. C., Gao, F., Abernethy, K., White, L. J. T., Karesh, W., Telfer, P., Wikings, J. E., Maucière, P., Marx, P. A., Barré-Sinoussi, F., Hahn, B. H., Müller-trutwin, M. C., and Simon, F. (2001). Wild Mandrillus sphinx are carriers of two types of lentivirus. *J. Virol.* 15, 7086-7096.
16. Hu, J., Beer, B., Switzer, W. M., Foley, B., Kuiken, C. L., Korber, B. T., Souquière, S., Simone, F., and Hirsch, V. M. (2001). *8th annual HIV dynamics and evolution meeting, Paris, France.*
17. Hirsch, V. M., Dapolito, G. A., Goldstein, S., McClure, H., Emau, P., Fultz, P. N., Isahakia, M., Lenroot, R., Myers, G., and Johnson, P. R. (1993). A distinct African lentivirus from Sykes' monkeys. *J. Virol.* 67(3), 1517-28.
18. Tsujimoto, H., Hasegawa, A., Maki, N., Fukasawa, M., Miura, T., Speidel, S., Cooper, R. W., Moriyama, E., Gojobori, T., and Hayami, M. (1989). Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild caught African mandrill. *Nature* 341, 539-541.
19. Fukasawa, M., Miura, T., Hasegawa, A., Morikawa, S., Tsujimoto, H., Miki, K., Kitamura, T., and Hayami, M. (1988). Sequence of simian immunodeficiency virus from African Green Monkey, a new member of the HIV/SIV group. *Nature (London)* 333, 457-461.
20. Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A., and Hill, F. (1992). Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *EMBO J.* 11, 3405-3412.
21. Coffin, J. M. (1992). Genetic Diversity and evolution of retroviruses. *Current topics in Microbiology* 176, 143-164.

45. Delwart, E. L., Shpaer, E. G., Louwagie, J., McCutchan, F. E., Grez, M., Rübsamen-Waigmann, H., and Mullins, J. (1993). Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 262, 1257-1261.
46. Chen, Z., Telfer, P., Gettie, A., Reed, P., Zhang, L., Ho, D. D., and Marx, P. A. (1996). Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J. Virol.* 70(6), 3617-27.
47. Müller-Trutwin, M. C., Corbet, S., Dias Tavares, M., Hervé, V. M. A., Nerrienet, E., Georges-Courbot, M.-C., Saurin, W., Sonigo, P., and Barré-Sinoussi, F. (1996). The evolutionary rate of non-pathogenic simian immunodeficiency viruses (SIVagm) indicates a rapid and continuous replication *in vivo*. *Virology*.
48. (1993). PHYLIP--Phylogeny inference package version 3.5c. Felsenstein, J.
49. Nei, M., and Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418-426.
50. Li, W. H., Wu, C.-I., and Luo, C.-C. (1985). A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol. Biol. Evol.* 2, 150-174.
51. Gao, F., Robertson, D. L., Morrison, S. G., Huxiong Hui, Craig, S., Decker, J., Fultz, P. N., Girard, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H., and Sharp, P. M. (1996). The heterosexual HIV-1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of african origin. *J Virol* 70(10), 7013-7029.
52. Leigh-Brown, A. J., and Homes, E. C. (1994). Evolutionary biology of human immunodeficiency virus. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 25, 127-162.
53. Korber, B. T., Learn, G., Mullins, J. I., Hahn, B. H., and Wolinsky, S. (1995). Protecting HIV databases. *Nature* 378(6554), 242-4.
54. Loussert-Ajaka, I., Simon, F., Farfara, I., Houhou, N., Couto-Fernandez, J., Dazza, M. C., and Brun-Vezinet, F. (1994). Comparative study of single and nested PCR for the detection of proviral HIV2 DNA. *Res Virol* 145(5), 337-42.
55. Simon, F., Ly, T. D., Baillou-Beaufils, A., Fauveau, V., De-Saint-Martin, J., Loussert-Ajaka, I., Chaix, M. L., Saragosti, S., Courouce, A. M., Ingrand, D., and et, a. (1994). Sensitivity of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies [letter]. *AIDS* 8(11), 1628-9.
56. Eberle, J., Loussert-Ajaka, I., Brust, S., Zekeng, L., Hauser, P. H., Kaptue, L., Knapp, S., Damond, F., Saragosti, S., Simon, F., and Gurtler, L. G. (1997). Diversity of the immunodominant epitope of gp41 of HIV-1 subtype O and its validity for antibody detection. *J Virol Methods* 67(1), 85-91.
57. Mauclere, P., Damond, F., Apetrei, C., Loussert-Ajaka, I., Souquiere, S., Buzelay, L., Dalbon, P., Jolivet, M., Mony Lobe, M., Brun-Vezinet, F., Simon, F., and Barin, F. (1997). Synthetic peptide ELISAs for detection of and discrimination between group M and group O HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13(12), 987-93.
58. Apetrei, C., Loussert-Ajaka, I., Descamps, D., Damond, F., Saragosti, S., Brun-Vezinet, F., and Simon, F. (1996). Lack of screening test sensitivity during HIV-1 non-subtype B seroconversions. *AIDS* 10(14), F57-60.
59. Damond, F., Apetrei, C., Robertson, D. L., Souquiere, S., Lepretre, A., Matheron, S., Plantier, J. C., Brun-Vezinet, F., and Simon, F. (2001). Variability of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infecting patients living in france. *Virology* 280(1), 19-30.
60. Ondo, P., Willems, B., Fransen, K., Nkengasong, J., Janssens, W., Heyndrickx, L., Zekeng, L., Ndumbe, P., Simon, F., Saragosti, S., Gurtler, L., Peeters, M., Korber, B., Goudsmit, J., and van der Groen, G. (1998). Evaluation of different V3 peptides in an enzyme immunoassay for specific HIV type 1 group O antibody detection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(11), 963-72.
61. Johnson, P. R., Parks, D. E., Norrby, E., Lerner, R. A., Purcell, R. H., and Chanock, R. M. (1988). Site-directed ELISA identifies a highly antigenic region of the simian immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 4(3), 159-64.
62. Norrby, E., Putkonen, P., Albert, J., and Fenyo, E. M. (1991). Immunodominant antigenic sites in primate immunodeficiency viruses and *in vivo* protection. *Biotechnol Ther* 2(1-2), 21-9.
63. Miller, M. A., Murphey-Corb, M., and Montelaro, R. C. (1992). Identification of broadly reactive continuous antigenic determinants of simian immunodeficiency virus glycoproteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8(6), 1153-64.
64. Siegel, F., Norley, S., Hartung, S., and Kurth, R. (1992). B-cell epitope mapping of the entire SIVagm envelope glycoprotein including fine mapping of immunogenic regions. *J. Acquir. Imm. Def. Syndrom.* 5, 583-590.
65. Samuelson, A., Bjorling, E., Putkonen, P., Utter, G., Chiodi, F., and Norrby, E. (1993). Identification of four antibody-binding sites in the envelope glycoproteins of simian immunodeficiency virus, SIVsm. *AIDS* 7, 159.

66. Shafferman, A., Layne, A., Sadoff, J., Burke, D. S., Morton, W. R., and Benveniste, R. E. (1989). Antibody recognition of SIVmac envelope peptides in plasma from macaques experimentally infected with SIV/Mne. *AIDS Res Hum Retroviruses* 5(3), 327-36.
67. Suedois. (1998).
68. Diop, O. M., Gueye, A., Dias-Tavares, M., Kornfeld, C., Faye, A., Ave, P., Huerre, M., Corbet, S., Barré-Sinoussi, F., and Müller-Trutwin, M. C. (2000). High levels of viral replication during primary SIVagm infection are rapidly and strongly controlled in African Green Monkeys. *J. Virol.* 74(16), 7538-7547.
69. Goldstein, S., Engle, R., Olmsted, R. A., Hirsch, V. M., and Johnson, P. R. (1990). Detection of SIV antigens by HIV-1 antigen capture immunoassays. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3(2), 98-102.
70. Georges-Courbot, M. C., Moisson, P., Leroy, E., Pingard, A. M., Nerrienet, E., Dubreuil, G., Wickings, E. J., Debels, F., Bedjabaga, I., Poaty-Mavoungou, V., Hahn, N. T., and Georges, A. J. (1996). Occurrence and frequency of transmission of naturally occurring simian retroviral infections (SIV, STLV, and SRV) at the CIRMF Primate Center, Gabon. *Journal of Medical Primatology* 25(5), 313-26.
71. Lairmore, M. D., Lerche, N. W., Schultz, K. T., Stone, C. M., Brown, B. G., Hermann, L. M., Yee, J. A., and Jennings, M. (1990). SIV, STLV-I and type D retrovirus antibodies in captive rhesus macaques and immunoblot reactivity to SIV p27 in human and rhesus monkey sera. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6(11), 1233-8.
72. Lairmore, M. D., Cuthbert, P. S., Utley, L. L., Morgan, C. J., Dezzutti, C. S., Anderson, C. L., and Sedmak, D. D. (1993). Cellular localization of CD4 in the human placenta. Implications for maternal-to-fetal transmission of HIV. *J Immunol* 151, 1673-1681.
73. Lohman, B. L., Higgins, J., Marthas, M. L., Marx, P. A., and Pedersen, N. C. (1991). Development of simian immunodeficiency virus isolation, titration, and neutralization assays which use whole blood from rhesus monkeys and an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 29(10), 2187-92.
74. Thorstensson, R., Walther, L., Putkonen, P., Albert, J., and Biberfeld, G. (1991). A capture enzyme immunoassay for detection of HIV-2/SIV antigen. *J Acquir Immune Defic Syndr* 4(4), 374-9.
75. Otteken, A., Nick, S., Bergter, W., Voss, G., Faisst, A. C., Stahl-Hennig, C., and Hunsmann, G. (1992). Identification of a gag protein epitope conserved among all four groups of primate immunodeficiency viruses by using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 73(Pt 10), 2721-4.
76. Kodama, T., Burns, D. P., Silva, D. P., Veronese, F. D., and Desrosiers, R. C. (1991). Strain-specific neutralizing determinant in the transmembrane protein of simian immunodeficiency virus. *J Virol* 65(4), 2010-8.
77. Minassian, A. A., Kalyanaraman, V. S., Gallo, R. C., and Popovic, M. (1988). Monoclonal antibodies against human immunodeficiency virus (HIV) type 2 core proteins: cross-reactivity with HIV type 1 and simian immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(18), 6939-43.
78. Kent, K. A., Gritz, L., Stallard, G., Cranage, M. P., Collignon, C., Thiriart, C., Corcoran, T., Silvera, P., and Stott, E. J. (1991). Production and of monoclonal antibodies to simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *AIDS* 5(7), 829-36.
79. Kent, K. A., Rud, E., Corcoran, T., Powell, C., Thiriart, C., Collignon, C., and Stott, E. J. (1992). Identification of two neutralizing and 8 non-neutralizing epitopes on simian immunodeficiency virus envelope using monoclonal antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8(6), 1147-51.
80. Higgins, J. R., Sutjipto, S., Marx, P. A., and Pedersen, N. C. (1992). Shared antigenic epitopes of the major core proteins of human and simian immunodeficiency virus isolates. *J Med Primatol* 21(5), 265-9.
81. Burns, D. P., and Desrosiers, R. C. (1992). A caution on the use of SIV/HIV gag antigen detection systems in neutralization assays. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8(6), 1189-92.
82. Albert, J., Bjorling, E., von, G. A., Scarlatti, G., Zhang, Y. J., Fenyo, E. M., and Thorstensson, R. (1993). Antigen detection is a reliable method for evaluating HIV/SIV neutralization assays [letter; comment]. *Aids Res Hum Retroviruses* 9(6), 501-4.
83. Johnson, P. R., Goldstein, S., London, W. T., Fomsgaard, A., and Hirsch, V. M. (1990). Molecular clones of SIVsm and SIVagm: experimental infection of macaques and African green monkeys. *J Med Primatol* 19, 279-86.
84. Potts, B. J., Maury, W., and Martin, M. A. (1990). Replication of HIV-1 in primary monocyte cultures. *Virology* 175(2), 465-76.
85. Cook, R. F., Cook, S. J., and Issel, C. J. (1991). A nonradioactive micro-assay for released reverse transcriptase activity of a lentivirus. *Bio Techniques* 13, 380-86.
86. Ekstrand, D. H., Awad, R. J., Kallander, C. F., and Gronowitz, J. S. (1996). A sensitive assay for the quantification of reverse transcriptase activity based on the use of carrier-bound template and non-radioactive-product detection, with special reference to human-immunodeficiency- virus isolation. *Biotechnol Appl Biochem* 23(Pt 2), 95-105.
87. Ekstrand, D. H., Bottiger, D., Andersson, H., Gronowitz, J. S., and Clas, F. R. (1997). Reverse transcriptase and corresponding activity-blocking antibody for monitoring SIVsm infection in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13(7), 601-10.

88. McKeating, J. A., McKnight, A., McIntosh, K., Clapham, P. R., Mulder, C., and Weiss, R. A. (1989). Evaluation of human and simian immunodeficiency virus plaque and neutralization assays. *J Gen Virol* 70(Pt 12), 3327-33.
89. Baskin, G. B., Murphey-Corb, M., Martin, L. N., Davison-Fairburn, B., Hu, F. S., and Kuebler, D. (1991). Thymus in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Lab. Invest.* 65, 400-407.
90. Conway, M. D., Davison-Fairburn, B., Martin, L. N., Insler, M. S., and Murphey-Corb, M. (1991). Infection of rhesus monkeys with topical instillation of simian immunodeficiency virus (SIV)B670 into the conjunctival sac. *J Med Primatol* 20(4), 152-5.
91. Donehower, L. A., Bohannon, R. C., Ford, R. J., and Gibbs, R. A. (1990). The use of primers from highly conserved pol regions to identify uncharacterized retroviruses by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 28(1), 33-46.
92. Morrison, H. G., and Desrosiers, R. C. (1993). A PCR-based strategy for extensive mutagenesis of a target DNA sequence. *Biotechniques* 14(3), 454-7.
93. Müller, M. C. (1995). Doctorat de l'Université. Université Paris 7-Diderot, Paris.
94. Carpenter, C. C. (2000). Effect of ritonavir on saquinavir metabolism. *Jama* 283(22), 2936-7.
95. Johnston, M. I., and Hoth, D. F. (1993). Present status and future prospects for HIV therapies. *Science* 260(5112), 1286-93.
96. Descamps, D., Collin, G., Letourneur, F., Apetrei, C., Damond, F., Loussert-Ajaka, I., Simon, F., Saragosti, S., and Brun-Vezinet, F. (1997). Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. *J Virol* 71(11), 8893-8.
97. Larder, B. A., Darby, G., and Richman, D. D. (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 243(4899), 1731-4.
98. Miller, V., Sturmer, M., Staszewski, S., Groschel, B., Hertogs, K., de Bethune, M. P., Pauwels, R., Harrigan, P. R., Bloor, S., Kemp, S. D., and Larder, B. A. (1998). The M184V mutation in HIV-1 reverse transcriptase (RT) conferring lamivudine resistance does not result in broad cross-resistance to nucleoside analogue RT inhibitors. *AIDS* 12(7), 705-12.
99. Descamps, D., Apetrei, C., Collin, G., Damond, F., Simon, F., and Brun-Vezinet, F. (1998). Naturally occurring decreased susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors. *AIDS* 12(9), 1109-11.
100. DeClercq, e. a. (1999).
101. Martin, J. L., Wilson, J. E., Haynes, R. L., and Furman, P. A. (1993). Mechanism of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to 2',3'- dideoxyinosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13), 6135-9.
102. Tsai, C. C., Follis, K. E., Grant, R., Sabo, A., Nolte, R., Bartz, C., Bischofberger, N., and Benveniste, R. (1994). Comparison of the efficacy of AZT and PMEA treatment against acute SIVmne infection in macaques. *J Med Primatol* 23(2-3), 175-83.
103. Tsai, C. C., Follis, K. E., Sabo, A., Grant, R., and Bischofberger, N. (1995). Efficacy of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine treatment against chronic simian immunodeficiency virus infection in macaques. *J Infect Dis* 171(5), 1338-43.
104. Tsai, C. C., Follis, K. E., Beck, T. W., Sabo, A., Bischofberger, N., and Dailey, P. J. (1997). Effects of (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine monotherapy on chronic SIV infection in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13(8), 707-12.
105. Tsai, C. C., Emau, P., Follis, K. E., Beck, T. W., Benveniste, R. E., Bischofberger, N., Lifson, J. D., and Morton, W. R. (1998). Effectiveness of postinoculation (R)-9-(2-phosphonyl-methoxypropyl) adenine treatment for prevention of persistent simian immunodeficiency virus SIVmne infection depends critically on timing of initiation and duration of treatment. *J Virol* 72, 4265-4273.
106. Van Rompay, K. K., Otsyula, M. G., Tarara, R. P., Canfield, D. R., Berardi, C. J., McChesney, M. B., and Marthas, M. L. (1996). Vaccination of pregnant macaques protects newborns against mucosal simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 173(6), 1327-35.
107. Van Rompay, K. K., Berardi, C. J., Dillard-Telm, S., Tarara, R. P., Canfield, D. R., Valverde, C. R., Montefiori, D. C., Cole, K. S., Montelaro, R. C., Miller, C. J., and Marthas, M. L. (1998). Passive immunization of newborn rhesus macaques prevents oral simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 177(5), 1247-59.
108. Watson, A., Ranchalis, J., Travis, B., McClure, J., Sutton, W., Johnson, P. R., Hu, S. L., and Haigwood, N. L. (1997). Plasma viremia in macaques infected with simian immunodeficiency virus: plasma viral load early in infection predicts survival. *J Virol* 71, 284-290.
109. Balzarini, J., Weeger, M., Camarasa, M. J., De Clercq, E., and Uberla, K. (1995). Sensitivity/resistance profile of a simian immunodeficiency virus containing the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) toward the HIV-1-specific non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 211(3), 850-6.



110. Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-1958.
111. Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1996). The  $\beta$ -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85, 1135-1148.
112. Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., and Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381(6584), 661-6.
113. Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G., and 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(7), 1149-1158.
114. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., and Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381(6584), 667-673.
115. Lu, Z., Berson, J. F., Chen, Y., Turner, J. D., Zhang, T., Sharron, M., Jenks, M. H., Wang, Z., Kim, J., Rucker, J., Hoxie, J. A., Peiper, S. C., and Doms, R. W. (1997). Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12), 6426-31.
116. Marcon, L., Choe, H., Martin, K. A., Farzan, M., Ponath, P. D., Wu, L., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1997). Utilization of C-C chemokine receptor 5 by the envelope glycoproteins of a pathogenic simian immunodeficiency virus, SIVmac239. *J. Virol.* 71, 2522-2527.
117. Berson, J. F., Long, D., Doranz, B. J., Rucker, J., Jirik, F. R., and Doms, R. W. (1996). A seven transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell tropic human immunodeficiency virus type-1 strains. *J. Virol.* 70, 6288-6295.
118. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272(5263), 872-7.
119. Horuk, R., Hesselgesser, J., Zhou, Y., Faulds, D., Halks-Miller, M., Harvey, S., Taub, D., Samson, M., Parmentier, M., Rucker, J., Doranz, B. J., and Doms, R. W. (1998). The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J Biol Chem* 273(1), 386-91.
120. Jinno, A., Shimizu, N., Soda, Y., Haraguchi, Y., Kitamura, T., and Hoshino, H. (1998). Identification of the chemokine receptor TER1/CCR8 expressed in brain-derived cells and T cells as a new coreceptor for HIV-1 infection. *Biochem Biophys Res Commun* 243(2), 497-502.
121. Rucker, J., Edinger, A. L., Sharron, M., Samson, M., Lee, B., Berson, J. F., Yi, Y., Margulies, B., Collman, R. G., Doranz, B. J., Parmentier, M., and Doms, R. W. (1997). Utilization of chemokines receptors and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 71, 8999-9007.
122. Choe, H., Farzan, M., Konkel, M., Martin, K., Sun, Y., Marcon, L., Cayabyab, M., Berman, M., Dorf, M. E., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1998). The orphan seven-transmembrane receptor ApJ supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dual-tropic human immunodeficiency type 1. *J. Virol.* 72, 6113-6118.
123. Combadiere, C., Ahuja, S. K., Tiffany, H. L., and Murphy, P. M. (1996). Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *J. Leukoc. Biol.* 60(1), 147-152.
124. Edinger, A. L., Hoffman, T. L., Sharron, M., Lee, B. H., Yi, Y. J., Choe, W., Kolson, D. L., Mitrovic, B., Zhou, Y. Q., Faulds, D., Collman, R. G., Hesselgesser, J., Horuk, R., and Doms, R. W. (1998a). An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brains functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 72, 7934-7940.
125. Owman, C., Garzino-Demo, A., Cocchi, F., Popovic, M., Sabirsh, A., and Gallo, R. C. (1998). The leukotriene B-4 receptor functions as a novel type of coreceptor mediating entry of primary HIV-1 isolates into CD4-positive cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9530-9534.
126. Samson, M., Edinger, A. L., Stordeur, P., Rucker, J., Verhasselt, V., Sharron, M., Govaerts, C., Mollereau, C., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. (1998). ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol* 28(5), 1689-700.
127. Edinger, A. L., Amedee, A., Miller, K., Doranz, B. J., Endres, M., Sharron, M., Samson, M., Lu, Z.-H., Clements, J. E., Murphey-Corb, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Broder, C., and Doms, R. W. (1997a). Differential utilization of CCR5 by macrophage and T cell tropic simian immunodeficiency virus strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 4005-4010.
128. McKnight, A., Wilkinson, D., Simmons, G., Talbot, S., Picard, L., Ahuja, M., Marsh, M., Hoxie, J. A., and Clapham, P. R. (1997). Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent. *J Virol* 71(2), 1692-6.

129. Alkhatib, G., Liao, F., Berger, E. A., Farber, J. M., and Peden, K. W. (1997). A new SIV co-receptor, STRL33. *nature* 388(6639), 238.
130. Deng, H., Unutmaz, D., KewalRamani, V. N., and Littman, D. R. (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 388, 296-300.
131. Liao, F., Alkhatib, G., Peden, K. W., Sharma, G., Berger, E. A., and Farber, J. M. (1997). STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med* 185(11), 2015-23.
132. Pohlmann, S., Stolte, N., Munch, J., Ten Haaf, P., Heeney, J. L., Stahl-Hennig, C., and Kirchhoff, F. (1999). Co-receptor usage of BOB/GPR15 in addition to CCR5 has no significant effect on replication of simian immunodeficiency virus in vivo. *J Infect Dis* 180(5), 1494-502.
133. Farzan, M., Choe, H., Martin, K., Marcon, L., Hofmann, W., Karlsson, G., Sun, Y., Barrett, P., Marchand, N., Sullivan, N., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1997). Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection. *J. Exp. Med.* 186, 405-411.
134. Pleskoff, O., Trébouté, C., Brelot, A., Heveker, N., Seman, M., and Alizon, M. (1997). Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* 276, 1874-1878.
135. Chen, Z., Zhou, P., Ho, D. D., Landau, N. R., and Marx, P. A. (1997). Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry. *J. Virol.* 71, 2705-2714.
136. Chen, Z., Gettie, A., Ho, D. D., and Marx, P. A. (1998a). Primary SIVsm isolates use the CCR5 coreceptor from sooty mangabeys naturally infected in West Africa: A comparison of coreceptor usage of primary SIVsm, HIV-2, and SIVmac. *Virology* 246, 113-124.
137. Chen, Z., Kwon, D., Jin, Z., Monard, S., Telfer, P., Lu, C. Y., Aguilar, R. F., Ho, D. D., and Marx, P. A. (1998b). Natural infection of a homozygous delta24 CCR5 red-capped mangabey with an R2b-tropic simian immunodeficiency virus. *J. Exp. Med.* 188(11), 2057-2065.
138. Schols, D., and De Clercq, E. (1998). The simian immunodeficiency virus mnd(GB-1) strain uses CXCR4, not CCR5, as coreceptor for entry in human cells. *J. Gen. Virol.* 79, 2203-2205.
139. Shimizu, N., Soda, Y., Kanbe, K., Liu, H. Y., Mukai, R., Kitamura, T., and Hoshino, H. (2000). A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 74(2), 619-26.
140. Bazan, H. A., Alkhatib, G., Broder, C. C., and Berger, E. A. (1998). Patterns of CCR5, CXCR4, and CCR3 usage by envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *J Virol* 72(5), 4485-91.
141. Combadière, C., Salzwedel, K., Smith, E. D., Tiffany, H. L., Berger, E. A., and Murphy, P. M. (1998). Identification of CX<sub>3</sub>CR1: a chemotactic receptor for the human CX<sub>3</sub>C chemokine fractalkine, and a fusion coreceptor for HIV-1. *J. Biol. Chem.* 273, 23799-237804.
142. Bandres, J. C., Wang, Q. F., O'Leary, J., Baleaux, F., Amara, A., Hoxie, J. A., Zolla-Pazner, S., and Gorny, M. K. (1998). Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation. *J. Virol.* 72(3), 2500-4.
143. Agy, M. B., Frumkin, L. R., Corey, L., Coombs, R. W., Wolinsky, S. M., Koehler, J., Morton, W. R., and Katze, M. G. (1992). Infection of *Macaca nemestrina* by Human Immunodeficiency Virus type I. *Science* 257, 103-106.
144. Achong, B. C., Mansell, P. W. A., Epstein, M. A., and Clifford, P. (1971). Virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 46, 299-307.
145. Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., and Martin, M. A. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and non-human cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59(2), 284-291.
146. Adamis, M., Sharmeen, L., Kimpton, J., Romeo, J. M., Garcia, J. V., Matija Peterlin, B., Groudine, M., and Emerman, M. (1994). Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promotor-proximal transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 3862-3866.
147. Aitken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E., and Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76, 853-864.
148. Alaeus, A., Leitner, T., Lidman, K., and Albert, J. (1997). Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden. *AIDS* 11, 199-202.
149. Albert, J., Abrahamsson, B., Nagy, K., Aurelius, E., Gaines, H., Nyström, G., and Fenyö, M. (1990). Rapid development of isolate specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 4, 107-112.
150. Edinger, A. L., Mankowski, J. L., Doranz, B. J., B.J., M., Lee, B., Rucker, J., Sharron, M., Hoffman, T. L., Berson, J. F., Zink, M. C., Hirsch, V. M., Clements, J. E., and Doms, R. W. (1997b). CD4-independent, CCR5-

- dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent Simian immunodeficiency virus strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14742-14747.
151. Albrecht, H., Shakhov, A. N., and Jongeneel, C. V. (1992). Trans activation of the tumor necrosis factor alpha promoter by the human T-cell leukemia virus type I tax1 protein. *J. Virol.* 66, 6191-6193.
152. Aldovini, A., Debouck, C., Feinberg, M. B., Rosenberg, M., Arya, S. K., and Wong-Staal, F. (1986). Synthesis of the complete trans-activation gene product of human T-lymphotropic virus type III in *Escherichia coli*: demonstration of immunogenicity in vivo and expression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(18), 6672-6.
153. Kanki, P. J., Kurth, R., Becker, W., Dreesman, G., McLane, M. F., and Essex, M. (1985b). Antibodies to simian T-lymphotropic retrovirus type III in African green monkeys and recognition of STLV-III viral proteins by AIDS and related sera. *Lancet* i, 1330-1332.
154. Estaquier, J., Peeters, M., Bedjabaga, L., Honore, C., Bussi, P., Dixon, A., and Delaporte, E. (1991). Prevalence and transmission of simian immunodeficiency virus and simian T-cell leukemia virus in a semi-free-range breeding colony of mandrills in Gabon. *AIDS* 5(11), 1385-6.
155. Masuda, T., Tsujimoto, H., Ishikawa, K., Ohta, Y., Hayami, M., Ocheng, E. M., Johnson, B. K., Tukei, P. M., Delaporte, E., Cooper, R. W., and et al. (1988). Reactivities of antibodies to HIV and SIV in human sera in Kenya, Gabon, and Ghana. *Lancet* i(8580), 297.
156. Hendry, R. M., Wells, M. A., Phelan, M. A., Schneider, A. L., Epstein, J. S., and Quinnan, G. V. (1986). Antibodies to simian immunodeficiency virus in African Green Monkeys in Africa in 1957-1962. *Lancet* ii, 455.
157. Fultz, P. N., Gordon, T. P., D.C., A., and McClure, H. M. (1990). Prevalence of natural infection with SIVsmm and STLV-I in a breeding colony of sooty mangabey monkeys. *AIDS* 4, 619-625.
158. Phillips-Conroy, J. E., Jolly, C. J., Petros, B., Allan, J. S., and Desrosiers, R. C. (1994). Sexual transmission of SIVagm in wild grivet monkeys. *J Med Primatol* 23, 1-7.
159. Kuller, L., Benveniste, R. E., Watanabe, R., Tsai, C. C., and Morton, W. R. (1992). Transmission of SIVMne from female to male *Macaca nemestrina*. *J Med Primatol* 21(6), 299-307.
160. Jolly, C., Phillips-Conroy, J., Turner, T., Broussard, S., and Allan, J. (1996). SIVagm incidence over two decades in a natural population of Ethiopian grivet monkeys (*Cercopithecus aethiops aethiops*). *J Med Primatol* 25, 78-83.
161. Gardner, M. B. (1996). The history of simian AIDS. *J Med Primatol* 25(3), 148-57.
162. Nerrienet, E., Amouretti, X., Müller-Trutwin, M. C., Poaty-Mavoungou, V., Bedjebaga, I., Thi Nguyen, H., Dubreuil, G., Corbet, S., Wickings, E. J., Barré-Sinoussi, F., Georges, A. J., and Georges-Courbot, M.-C. (1998). Phylogenetic analysis of SIV and STLV type I in mandrills (*mandrillus sphinx*): indications that intracolony transmissions are predominantly the result of male-to-male aggressive contacts. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14(9), 785-796.
163. Broder, C. C., and Jones-Trower, A. (2000). Coreceptor use by primate lentiviruses.
164. Emau, P., McClure, H. M., Isahakia, M., Else, J. G., and Fultz, P. N. (1991). Isolation from African Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 65, 2135-2140.
165. Fultz, P. N., Siegel, R. L., Brodie, A., Mawle, A. C., Stricker, R. B., Brent Swenson, R., Anderson, D. C., and McClure, H. M. (1991a). Prolonged CD4+ lymphocytopenia and thrombocytopenia in a chimpanzee persistently infected with human immunodeficiency virus type I. *J. Infect. Dis.* 163, 441-447.
166. Novembre, F. J., Saucier, M., Anderson, D. C., Klumpp, S. A., O'Neil, S. P., Brown, C., Hart, C. E., Guenther, P. C., Swenson, R. B., and McClure, H. M. (1997). Development of AIDS in a chimpanzee infected with human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 71, 4086-4091.
167. Daniel, M. D., Letvin, N. L., King, N. W., Kannagi, M., Sehgal, P. K., Hunt, R. D., Kanki, P. J., Essex, M., and Desrosiers, R. C. (1985). Isolation of a T-cell tropic HTLV-III like retrovirus from macaques. *Science* 228, 1201-1204.
168. Kestler, H. W., Ringler, D. J., Mori, K., Panicall, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., and Desrosiers, R. C. (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65, 651-662.
169. Dewhurst, S., Embretson, J. E., Anderson, D. C., Mullins, J. I., and Fultz, P. N. (1990). Sequence analysis and acute pathogenicity of molecularly cloned SIVsmmPBj14. *Nature* 345, 636-640.
170. Luciw, P. A., Shaw, K. E., Unger, R. E., Planelles, V., Stout, M. W., Lackner, J. E., Pratt-Lowe, E., Leung, N. J., Banapur, B., and Marthas, M. L. (1992). Genetic and biological comparisons of pathogenic and nonpathogenic molecular clones of simian immunodeficiency virus (SIVmac). *AIDS Res Hum Retroviruses* 8(3), 395-402.
171. Naidu, Y. M., and al., e. (1988). Characterization of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus (SIVmac) and human immunodeficiency virus type 2: persistent infection of rhesus monkeys with molecularly cloned SIVmac. *J. Virol.* 62, 4691-4696.
172. Kornfeld, H., Riedel, N., Viglianti, G. A., Hirsch, G. A., and Mullins, J. (1987). Cloning of HTLV4 and its relation to human and simian immunodeficiency viruses. *Nature* 326, 610-613.

173. Edmonson, P., Murphey-Corb, M., Martin, L. N., Delahunty, C., Heeney, J., Kornfeld, H., Donahue, P. R., Learn, G. H., Hood, L., and Mullins, J. I. (1998). Evolution of a simian immunodeficiency virus pathogen. *J Virol* 72(1), 405-14.
174. Putkonen, P., Warstedt, K., Thorstensson, R., and al., e. (1989). Experimental infection of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with simian immunodeficiency virus (SIV sm). *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2, 359-365.
175. Hirsch, V. M., and Johnson, P. R. (1994). Pathogenic diversity of simian immunodeficiency viruses. *Virus Res.* 32, 183-203.
176. Fultz, P. N., McClure, H. M., Anderson, D. C., Swenson, R. B., Anand, R., and Srinivasan, A. (1986). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5286-5290.
177. Zhang, J., Martin, L. N., Warson, E. A., Montelaro, R. C., West, M., Epstein, L., and Murphy-Corb, M. (1988). Simian immunodeficiency virus/Delta-induced immunodeficiency disease in rhesus monkeys: relation of antibody response and antigenemia. *J. Infect. Dis.* 158, 1277-1286.
178. Fultz, P. N., and Zack, P. M. (1994). Unique lentivirus-host interactions : SIVsmmPBj14 infection of macaques. *Virus Res* 32, 205-225.
179. Fultz, P. N., McClure, H. M., Anderson, D. C., and Switzer, W. M. (1989). Identification and biologic characterization of an acutely lethal variant of simian immunodeficiency virus from sooty mangabeys (SIV/SMM). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5, 397-409.
180. Hirsch, V. M., Campbell, B. J., Bailes, E., Goeken, R., Brown, C., Elkins, W. R., Axthelm, M., Murphey-Corb, M., and Sharp, P. (1999). Characterization of a novel Simian Immunodeficiency virus (SIV) from L'Hoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*): Implications for the origins of SIVmnd and other primate lentiviruses. *J. Virol.* 73, 1036-1045.
181. Müller, M. C., Herve, V., Corbet, S., Dias Tavares, M., Nerrienet, E., Mathiot, C., Morvan, J., Saurin, W., Sonigo, P., and Barre-Sinoussi, F. (1995). *Cold Spring Harbor Retrovirus Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory.*
182. Gravell, M., London, W. T., Hamilton, R. S., Stone, G., and Monzon, M. (1989). Infection of macaque monkeys with simian immunodeficiency virus from African green monkeys: virulence and activation of latent infection. *J. Med. Primatol.* 18, 247-254.
183. Fultz, P. N., Schwiebert, R., and Stallworth, J. (1995). AIDS-like disease following mucosal infection of pig-tailed macaques with SIVsmmPBj14. *J Med Primatol* 24(3), 102-7.
184. Hirsch, V., Dapolito, G., Johnson, P. R., Elkins, W. R., London, W. T., Montali, R. J., Goldstein, S., and Brown, C. (1995). Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of *in vivo* replication. *J. Virol.* 69, 955-967.
185. Smith, S. M., Makuwa, M., Lee, F., Gettie, A., Russo, C., and Marx, P. A. (1998). SIVrcm infection of macaques. *J Med Primatol* 27(2-3), 94-8.
186. Hirsch, V. M., Dapolito, G. A., Goldstein, S., McClure, H., Emau, P., Fultz, P. N., Isahakia, M., Lenroot, R., Myers, G., and Johnson, P. R. (1993a). A distinct African lentivirus from sykes' monkeys. *J. Virol.* 67, 1517-1528.
187. Rey-Cuille, M. A., Berthier, J. L., Bomsel-Demontoy, M. C., Chaduc, Y., Montagnier, L., Hovanessian, A. G., and Chakrabarti, L. A. (1998). Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. *J. Virol.* 72(5), 3872-3886.
188. Holzammer, S., Holznagel, E., Kaul, A., Kurth, R., and Norley, S. (2001). High virus loads in naturally and experimentally SIVagm infected african green monkeys. *J. I.* 283(2), 324-31.
189. Daniel, M. D., Kirchnhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K., and Desrosiers, R. C. (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258, 1938-1941.
190. Stott, E. J., Almond, N., West, W., Kent, K., Cranage, M., and Rud, E. (1994). *Neuvième Colloques des Cents Grades, Lyon: Fondation Merieux.*
191. Bogers, W. M., Niphuis, H., ten Haaft, P., Laman, J. D., Koornstra, W., and Heeney, J. L. (1995). Protection from HIV-1 envelope-bearing chimeric simian immunodeficiency virus (SHIV) in rhesus macaques infected with attenuated SIV: consequences of challenge. *AIDS* 9(12), F13-8.
192. Cranage, M. P., Whatmore, A. M., Sharpe, S. A., Cook, N., Polyanskaya, N., Leech, S., Smith, J. D., Rud, E. W., Dennis, M. J., and Hall, G. A. (1997). Macaques infected with live attenuated SIVmac are protected against superinfection via the rectal mucosa. *Virology* 229(1), 143-54.
193. Li, J., Lord, C. I., Haseltine, W., Letvin, N. L., and Sodrosky, J. (1992). Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. *J. Acquir. Immune Def. Syndr.* 5, 639-646.
194. Hu, S. L., Abrams, K., Misher, L., Stallard, V., Moran, P., Zarling, J. M., Langlois, A. J., Kuller, L., Morton, W. R., and Benveniste, R. E. (1992). Evaluation of protective efficacy of recombinant subunit vaccines against simian immunodeficiency virus infection of macaques. *J Med Primatol* 21(2-3), 119-25.

195. Rud, E. W., Cranage, M., Yon, J., Quirk, J., Ogilvie, L., Cook, N., Webster, S., Dennis, M., and Clarke, B. E. (1994). Molecular and biological characterization of simian immunodeficiency virus macaque strain 32H proviral clones containing nef size variants. *J Gen Virol* 75(Pt 3), 529-43.
196. Almond, N., Kent, K., Cranage, M., Rud, E., Clarke, B., and Stott, E. J. (1995). Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells. *Lancet* 345(8961), 1342-4.
197. Baba, T. W., Jeong, Y. S., Pennick, D., Bronson, R., Greene, M. F., and Ruprecht, R. M. (1998). Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science* 267(5205), 1820-5.
198. Wyand, M., Manson, K., Lackner, A., and et, a. (1998). Resistance of neonatal monkeys to live attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus. *Nat Med.* 3, 32-36.
199. Sodora, D. L., Sheridan, K. E., Marx, P. A., and Connor, R. I. (1999). Immunization with a live, attenuated simian immunodeficiency virus vaccine leads to restriction of viral diversity in Rhesus macaques not protected from pathogenic challenge. *J Virol* 73(5), 4443-6.
200. Almond, N. M., and Heeney, J. L. (1998). AIDS vaccine development in primate models. *Aids* 12(Suppl A), S133-40.
201. Gonda, M. A., Braun, M. J., Carter, S. J., Kost, T. A., Bess, J. W., Jr., Arthur, L. O., and Vander Maaten, M. J. (1987). Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature* 287, 607-614.
202. Olmsted, R. A., Hirsch, V. M., Purcell, R. H., and Johnson, P. R. (1989). Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus : genome organisation and relationship to other lentiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci* 86, 8088-8092.
203. Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., Retzel, E., Tiollais, P., Haase, A., and Wain-Hobson, S. (1985). Nucleotide sequence of the Visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 43, 369-342.
204. Stephens, R. M., Casey, J. W., and Rice, N. R. (1986). Equine infectious anemia virus gag and pol genes: relatedness to visna and AIDS virus. *Science* 231, 589-594.
205. Dissotele, T. R. (1996). The phylogeny of Old World monkeys. *Evol. Anthropol.* 5, 18-24.
206. Gautier-Hion, A., Bourlière, F., Gautier, J.-P., and Kingdon, J. (1988). "A primate radiation: evolutionary biology of the African guenon." (C. U. Press, Ed.) Cambridge University Press, Cambridge.
207. Harris, E. E., and Dissotele, T. R. (1998). Nuclear gene trees and the phylogenetic relationships of the mangabeys (Primates: Papionini). *Mol. Biol. Evol.* 15, 892-900.
208. Van der Kuyl, A. C., Kuiken, C. L., Dekker, J. T., and Goudsmit, J. (1995). Phylogeny of African monkeys based upon mitochondrial 12S rRNA sequences. *J. Mol. Evol.* 40, 173-180.
209. Hahn, B. H., Shaw, G. M., DeCock, K., and Sharp, P. M. (2000). AIDS as zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287, 607-614.
210. Hirsch, V. M. H., McGann, C., Dapolito, G., Goldstein, S., Ogen-Odoi, A., Biryawaho, B., Lakwo, T., and Johnson, P. R. (1993). Identification of a new subgroup of SIVagm in tantalus monkeys. *Virology* 197, 426-430.
211. Sharp, P. M., Bailes, E., Robertson, D. L., Gao, F., and Hahn, B. H. (1999). Origins and evolution of AIDS virus. *Biol. Bull.* 196, 338-342.
212. Sharp, P. M., Robertson, D. L., and Hahn, B. H. (1995). Cross-species transmission and recombination of AIDS viruses. *Philos. Trans. r. Soc. London, Ser. B* 349, 41-47.
213. Courgnaud, V., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Mpoudi-Ngole, E., Bourgeois, A., Delaporte, E., and Peeters, M. (2001). Characterization of a novel simian immunodeficiency virus from guereza colobus monkeys (*Colobus guereza*) in Cameroon: a new lineage in the nonhuman primate lentivirus family. *J Virol* 75(2), 857-66.
214. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, I. O., Peeters, M., Shaw, G., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436-440.
215. Janssens, W. (1994). Phylogenetic analysis of a new chimpanzee lentivirus SIVcpz-gab2 from a wild-captured chimpanzee from Gabon. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1191-1192.
216. Peeters, M., Honore, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, R. W., and Delaporte, E. (1989). Isolation and partial characterization of an HIV - related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 3, 625-630.
217. Wu, X. X., Tu, X. M., He, F. Q., Shi, H. J., W, C. Z., Wei, Q., Jiang, H., and Shi, J. D. (1991). Studies on the monitoring of viruses in Chinese rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Chin. J. Lab. Anim. Sci.* 1, 179-183.
218. Marx, P. A., Li, Y., Lerhe, N. W., Sutjipto, S., Gettie, A., Yee, J. A., Brotman, B. H., Prince, A. M., Hanson, A., Webster, R. G., and Desrosiers, R. C. (1991). Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a West African pet sooty mangabey. *J. Virol.* 65, 4480-4485.
219. Peeters, M., Janssens, W., Franssen, K., Brandful, J., Heyndrickx, L., Koffi, K., Delaporte, E., Piot, P., Gershby-Damet, G. M., and Van der Groen, G. (1994). Isolation of simian immunodeficiency viruses from two

- sooty mangabeys in Cote d'Ivoire: virological and genetic characterization and relationship to other HIV type 2 and SIVsm/mac strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10(10), 1289-94.
220. Allan, J. S., Short, M., Taylor, M. E., Su, S., Hirsch, V. M., Johnson, P. R., Shaw, G. M., and Hahn, B. H. (1991). Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *J. Virol.* 65, 2816-2828.
221. Baier, M., Garber, C., Müller, C., Cichutek, K., and Kurth, R. (1990). Complete nucleotide sequence of a simian immunodeficiency virus from African Green Monkeys : a novel type of intergroup divergence. *Virology* 176, 216-212.
222. Daniel, M. D., Li, Y., Naidu, Y., Durda, P. J., Schmidt, D. K., Troup, C. D., Silva, D. P., MacKey, J. J., Kestler III, H. W., Seghal, P. K., King, N. W., Ohta, Y., and Hayami, M. (1988). Simian immunodeficiency virus from African Green Monkeys. *J. Virol* 62, 4123-4128.
223. Fomsgaard, A., Hirsch, V. M., Allan, J. S., and Johnson, P. R. (1991). A highly divergent proviral DNA clone of SIV from a distinct species of African Green Monkey. *Virology* 182, 397-402.
224. Jin, M. J., Hui, H., Robertson, D. L., Müller, M. C., Barré-Sinoussi, F., Hirsch, V. M., Allan, J. S., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1994). Mosaic genome structure of simian immunodeficiency virus from West African monkeys. *EMBO J.* 13, 2935-2947.
225. Johnson, P. R., Fomsgaard, A., Allan, J., Gravell, M., London, W. T., Olmstead, R. A., and Hirsch, V. M. (1990). Simian immunodeficiency viruses from African Green monkeys display unusual genetic diversity. *J. Virol.* 64, 1068-1092.
226. Muller, M. C., Saksena, N. K., Nerrienet, E., Chappey, C., Herve, V. M., Durand, J. P., Legal-Campodonico, P., Lang, M. C., Digoutte, J. P., Georges, A. J., and et al. (1993). Simian immunodeficiency viruses from central and western Africa: evidence for a new species-specific lentivirus in tanzania monkeys. *J Virol* 67(3), 1227-35.
227. Soares, M. A., Robertson, D. L., Hui, H., Allan, J. S., Shaw, G. M., and Hahn, B. H. (1997). A full-length and replication-competent proviral clone of SIVagm from tanzania monkeys. *Virology* 228(2), 394-9.
228. Beer, B., Bailes, E., Goeken, R., Dapolito, G., Coulibaly, C., Norley, S. G., Kurth, R., Gautier, J. P., Gautier-Hion, A., Vallet, D., Sharp, P. M., and Hirsch, V. M. (1999). SIV from sun-tailed monkeys (*Ceropithecus solatus*): Evidence for host-dependent evolution of SIV within the *C. lhoesti* superspecies. *J. Virol.* 73, 7734-7744.
229. Tsujimoto, H., Cooper, R. W., Cooper, T., Fukasawa, M., Miura, T., Ohta, Y., Ishikawa, K., Nakai, M., Frost, E., Roelants, G. E., Roffi, J., and Hayami, M. (1988). Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 62, 4044-4050.
230. Beer, E. B., Bailes, E., Sharp, P. M., and Hirsch, V. M. (2000). Diversity and evolution of primate lentiviruses. In: *Kuiken, C., B. Foley, B. Hahn, P.A. Marx, F. McCutchan, J. Mellors, J. Mullins, S. Wolinsky, B. Korber (Eds): Human retroviruses and AIDS. 1999. A compilation and analyses of nucleic acid and amino acid sequences.* Los Alamos National Laboratory, Los Alamos N.M., 460-474. <http://hiv-web.lanl.gov>.
231. Corbet, S., Muller-Trutwin, M. C., Versmisse, P., Delarue, S., Ayouba, A., Lewis, J., Brunak, S., Martin, P., Brun-Vezinet, F., Simon, F., Barre-Sinoussi, F., and Mauciere, P. (2000). *env* sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol* 74(1), 529-34.
232. Peeters, M., Franssen, K., Delaporte, E., van den Haesevelde, M., Gershy-Damet, G., Kestens, L., van der Groen, G., and Piot, P. (1992). Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate cpz-ant) from a wild captured chimpanzee. *AIDS* 6, 447-451.
233. Vanden Haesevelde, M. M., Peeters, M., Jannes, G., Janssens, W., van der Groen, G., Sharp, P. M., and Saman, E. (1996). Sequence analysis of a highly divergent HIV-1-related lentivirus isolated from a wild captured chimpanzee. *Virology* 221(2), 346-50.
234. Gagneux, P., Wills, C., Gerloff, U., Tautz, D., Morin, P. A., Boesch, C., Fruth, B., Hohmann, G., Ryder, O. A., and Woodruff, D. S. (1999). Mitochondrial sequences show diverse evolutionary histories of African hominoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9), 5077-82.
235. Morin, P. A. (1994). Kin selection, social structure, gene flow, and the evolution of chimpanzees. *Science* 265, 1193-1201.
236. Muller-Trutwin, M. C., Corbet, S., Souquiere, S., Roques, P., Versmisse, P., Ayouba, A., Delarue, S., Nerrienet, E., Lewis, J., Martin, P., Simon, F., Barre-Sinoussi, F., and Mauciere, P. (2000). SIVcpz from a naturally infected Cameroonian chimpanzee: biological and genetic comparison with HIV-1 N. *J Med Primatol* 29(3-4), 166-72.
237. Vandamme, A. M., Schmit, J. C., Van Dooren, S., Van Laethem, K., Gobbers, E., Kok, W., Goubau, P., Witvrouw, M., Peetermans, W., De Clercq, E., and Desmyter, J. (1996). Quantification of HIV-1 RNA in plasma: comparable results with the NASBA HIV-1 RNA QT and the AMPLICOR HIV monitor test. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13(2), 127-39.

238. Takehisa, J., Bikandou, B., Ido, E., Mboudjeka, I., M'Vouenze, R., Nzoukoudi, M. Y., Harada, Y., Yamaguchi-Kabata, Y., Miura, T., M'Pandi, M., Parra, H. J., M'Pele, P., and Hayami, M. (1999). Natural infection of chimpanzees with new lentiviruses related to HIV-1/SIVcpz. *J Med Primatol* 28(4-5), 169-73.
239. Loussert-Ajaka, I., Descamps, D., Simon, F., Brun-Vézinet, F., Ekwalanga, M., and Saragosti, S. (1995). Genetic diversity and HIV detection by polymerase chain reaction [letter]. *Lancet* 346(8979), 912-3.
240. Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.-C., Barré-Sinoussi, F., and Brun-Vézinet, F. (1998). Identification of a new human Immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4(9), 1032-1037.
241. Souquière, S., Roques, P., Ayouba, A., Robertson, D. L., Apetrei, C., Muller-Trutwin, M. C., Barré-Sinoussi, F., Nerrienet, E., and Simon, F. (2000). *13th International AIDS conference Durban, South Africa.*
242. Peeters, M., and Sharp, P. M. (2000). Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* 14(Suppl 3), S129-140.
243. Maucière, P., Loussert-Ajaka, I., Damon, F., Fagot, P., Souquière, S., Monny Lobe, M., Mbopi Keou, F. X., Barré-Sinoussi, F., Saragosti, S., Brun-Vézinet, F., and Simon, F. (1997). Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *AIDS* 11, 445-453.
244. Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M., and Ho, D. D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391, 594-597.
245. Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S., and Bhattacharya, T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288(5472), 1789-96.
246. Hunt, R. D., Blake, B. J., Chalifoux, L. V., Sehgal, P. K., King, N. W., and Letvin, N. L. (1983). Transmission of naturally occurring lymphoma in macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(16), 5085-9.
247. Letvin, N. L., Eaton, K. A., Aldrich, W. R., Sehgal, P. K., Blake, B. J., Schlossman, S. F., King, N. W., and Hunt, R. D. (1983). Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(9), 2718-22.
248. Kannagi, M., Yetz, J. M., and Letvin, N. L. (1985). *In vitro* growth characteristics of simian T-lymphotropic virus type III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7053-7057.
249. Khan, A. S., Galvin, T. A., Lowenstine, L. J., Jennings, M. B., Gardner, M. B., and Buckler, C. E. (1991). A highly divergent simian immunodeficiency virus (SIVstm) recovered from stored stump-tailed macaque tissues. *J Virol* 65(12), 7061-5.
250. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dautet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.-L., and Montagnier, L. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-346.
251. Chen, Z., Telfer, P., Reed, P., Zhang, L., Getti, A., Ho, D. D., and Marx, P. A. (1995). Isolation and characterization of the first simian immunodeficiency virus from a feral sooty mangabey (*Cercocebus atys*) in West Africa. *J Med Primatol* 24(3), 108-15.
252. Chen, Z., Luckay, A., Sodora, D. L., Telfer, P., Reed, P., Getti, A., Kanu, J. M., Sadek, R. F., Yee, J., Ho, D. D., Zhang, L., and Marx, P. A. (1997a). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of SIV infected sooty mangabeys. *J. Virol.* 71, 3953-3960.
253. Gao, F., Yue, L., Robertson, D. L., Hill, S. C., Hui, H., Biggar, R. J., Neequaye, A. E., M, W. T., Ho, D. D., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1994). Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.* 68, 7433-7447.
254. Gao, F., Yue, L., White, A. T., Pappas, P. G., Barchue, J., Hanson, A. P., Greene, B. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., and Hahn, B. H. (1992). Human infection by genetically diverse SIVsm-related HIV-2 in West Africa. *Nature* 358, 495-499.
255. Khabbaz, R. F., Heneine, W., George, J. R., Parekh, B., Rowe, T., Woods, T., Switzer, W. M., McClure, H. M., Murphey-Corb, M., and Folks, T. M. (1994). Brief report: infection of a laboratory worker with simian immunodeficiency virus. *N Engl J Me* 330(3), 172-7.
256. Allan, J. S., Kanda, P., Kennedy, R. C., Cobb, E. K., Anthony, M., and Eichberg, J. W. (1990). Isolation and characterization of simian immunodeficiency viruses from two subspecies of African Green Monkeys. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6, 275-285.
257. Lernould, J. M. (1988). Classification and geographical distribution of guenons: a review. In "A primate radiation: evolutionary biology of the African guenons" (A. Gautier-Hion, F. Bourliere, and J.-P. Gautier, Eds.), pp. 54-78. Cambridge University Press, Cambridge.
258. Baier, M., Werner, A., Cichutek, K., Gerber, C., Müller, C., Kraus, G., Ferdinand, F. J., Hartung, S., Papas, T. S., and Kurth, R. (1989). Molecularly cloned simian immunodeficiency virus SIVagm3 is highly divergent from other SIVagm isolates and is biologically active *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 63, 5119-5123.
259. Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E. K., Murthy, K. K., Schneider, J., Mergia, A., and Luciw, P. A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* 201, 187-199.

260. Kodama, T., Silva, D. P., Daniel, M. D., Philips-Conroy, J. E., Jolly, C. J., Rogers, J., and Desrosiers, R. C. (1989). Prevalence of antibodies to SIV in baboons in their native habitat. *AIDS Res. Hum. retroviruses* 3, 337-343.
261. Jin, M. J., Rogers, J., Philips-Conroy, J. E., Allan, J. S., Desrosiers, R., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1994). Infection of a yellow baboon with simian immunodeficiency virus from African green monkeys: evidence for cross-species transmission in the wild. *J. Virol.* 68, 8454-8460.
262. van Rensburg, E. J., Engelbrecht, S., Mwenda, J., Laten, J. D., Robson, B. A., Stander, T., and Chege, G. K. (1998). Simian immunodeficiency viruses (SIVs) from eastern and southern Africa: detection of a SIV<sub>agm</sub> variant from a chacma baboon. *J Gen Virol* 79(Pt 7), 1809-14.
263. Bibollet-Ruche, F., Galat-Luong, A., Cuny, G., Sarni-Manchado, P., Galat, G., Durand, J.-P., Pourrut, X., and Veas, F. (1996). Simian immunodeficiency virus infection in a patas monkey (*Erythrocebus patas*): evidence for a cross-species transmission from African green monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) in the wild 77, 773-781.
264. Tomonaga, K., Katahira, J., Fukasawa, M., Hassan, M. A., Kawamura, M., Akari, H., Miura, T., Goto, T., Nakai, M., Suleman, M., Isahakia, M., and Hayami, M. (1993). Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from African white-crowned mangabey monkeys (*Cercocebus torquatus lunulatus*). *Arch. Virol.* 129, 79-92.
265. Osterhaus, A. D., Pedersen, N., van Amerongen, G., Frankenhuis, M. T., Marthas, M., Reay, E., Rose, T. M., Pamungkas, J., and Bosch, M. L. (1999). Isolation and partial characterization of a lentivirus from talapoin monkeys (*Myopithecus talapoin*). *Virology* 260(1), 116-24.
266. Harrison, M. J. S. (1988). A new species of guenon (*genus Cercopithecus*) from Gabon. *J. Zool. Lond* 215, 561-575.
267. Dutrillaux, B., Viegas-Pequignot, E., and Masse, R. (1988). Complete or almost complete analogy of chromosome binding between the baboon (*Papio papio*) and man. *Hum. Genet.* 43, 37-46.
268. Korber, B., Theiler, J., and Wolinsky, S. (1998). Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1. *Science* 280(5371), 1868-71.
269. Querat, G., Audoly, G., Sonigo, P., and Vigne, R. (1990). Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology* 175(2), 434-47.
270. Sharp, P. M., Bailes, E., Gao, F., Beer, B. E., Hirsch, V. M., and Hahn, B. H. (2000). Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. *Biochem Soc Trans* 28(2), 275-82.
271. Clewley, J. P., Lewis, J. C. M., Brown, D. W. G., and Gadsby, E. L. (1998). A novel simian immunodeficiency virus (SIV<sub>drl</sub>) pol sequence from the drill monkey, *Mandrillus leucophaeus*. *J. Virol.* 72, 10305-10309.
272. Beer, B., Hu, J., Switzer, W. M., Foley, B., Kuiken, C. L., Tooze, Z., Souquière, S., Simon, F., Korber, B. T., and Hirsch, V. M. (2001). *8th annual HIV dynamics and evolution meeting, Paris, France.*
273. Beer, B. (2001a). *Compendium.*
274. Abela, B., Auzel, P., Courgnaud, V., Liegeois, F., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Ngole, E. M., Koulagna, D., Hahn, B. H., Delaporte, E., and Peeters, M. (2001). *8th Annual HIV Dynamics and Evolution Meeting, Paris, France.*
275. Courgnaud, V., Formenty, P., Akoua-koffi, C., Noe, R., Boesch, C., Delaporte, E., and Peeters, M. (2001). *8th annual HIV dynamics and evolution meeting, Paris, France.*
276. Fauci, A. S. (1993). Immunopathogenesis of HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6(6), 655-62.
277. Kinloch De Loes, S., De Saussure, P., Saurat, J. H., Stadler, H., Hirschel, B., and Perrin, L. H. (1993). Symptomatic primary immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Infect. Dis.* 17, 59-65.
278. Tindall, B., Barker, S., Donovan, B., Barnes, T., Roberts, J., Kronenberg, C., Gold, J., Penny, R., and Cooper, D. (1988). Characterization of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 148, 945-949.
279. Vanhems, e. a. (1996). *11° CIS, Vancouver.*
280. Kessler, H. A., Blaauw, B., Spear, J., Paul, D. A., Falk, L. A., and Landay, A. (1987). Diagnosis of human immunodeficiency virus infection in seronegative homosexuals presenting with an acute viral syndrome. *JAMA* 258(9), 1196-9.
281. Embretson, J., Zupancic, M., Beneke, J., Till, M., Wolinsky, S., Ribas, J. L., Burke, A., and Haase, A. T. (1993). Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and *in situ* hybridization reveals latent and permissive infections at single -cell resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 357-361.
282. Pantaleo, G., Graziosi, C., and Fauci, A. S. (1993b). The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Seminars Immunol.* 5, 157-163.
283. Pantaleo, G., Graziosi, C., and Fauci, A. S. (1993). The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection. *Aids.*



284. Clark, S. J., Saag, M. S., Decker, W. D., Campbell-Hill, S., Roberson, J. L., Veldkamp, P. J., Kappes, J. C., Hahn, B. H., and Shaw, G. M. (1991). High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection [see comments]. *N Engl J Med* 324(14), 954-60.
285. Daar, E. S., Moudgil, T., Meyer, R. D., and Ho, D. D. (1991). Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324, 961-964.
286. Carmichael, A., Jin, X., Sissons, P., and Borysiewicz, L. (1993). Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J Exp Med* 177, 249-256.
287. Clerici, M., Giorgi, J. V., Chou, C. C., Gudeman, V. K., Zack, J. A., Gupta, P., Ho, H. N., Nishanian, P. G., Berzofsky, J. A., and Shearer, G. M. (1992). Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *J. Infect. Dis.* 165, 1012-1019.
288. Koup, R., Safrit, J., Cao, Y., Andrews, C., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, 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(7), 4650-4655.
289. Sheppard, H. W., Ascher, M. S., McRae, B., Anderson, R. E., Lang, W., and P, A. J. (1991). The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *J. Acquired Immune Def. Syndr.* 4, 704-712.
290. Shearer, G. M., and Clerici, M. (1993). Abnormalities of immune regulation in human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Res* 33(1 Suppl), S71-4; discussion S74-5.
291. Graziosi, C., Pantaleo, G., Demarest, J., Cohen, O., Vaccarezza, M., Butini, L., Montroni, M., and Fauci, A. (1993). HIV-1 infection in the lymphoid organs. *AIDS* 7(S2), S53-S58.
292. Ho, D., Sarngadharan, M., Resnick, L., Dimarzo-veronese, F., Rota, T., and Hisch, M. (1985). Primary human T-lymphotropic virus type III infection. *Ann Intern Med* 103(6), 880-883.
293. Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and 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(7), 4650-5.
294. Connick, E., Marr, D. G., Zhang, X. Q., Clark, S. J., Saag, M. S., Schooley, R. T., and Curiel, T. J. (1996). HIV-specific cellular and humoral immune responses in primary HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(12), 1129-40.
295. Pellegrin, I., Legrand, E., Neau, D., Bonot, P., Masquelier, B., Pellegrin, J. L., Ragnaud, J. M., Bernard, N., and Fleury, H. J. (1996). Kinetics of appearance of neutralizing antibodies in 12 patients with primary or recent HIV-1 infection and relationship with plasma and cellular viral loads. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 11(5), 438-47.
296. Pilgrim, A., and al. (1997). Neutralizing antibody responses at various stages of infection with human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.*
297. Moore, J. P., Cao, Y., Ho, D. D., and Koup, R. A. (1994). Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 68(8), 5142-55.
298. Balotta, C., Bagnarelli, P., Riva, C., Valenza, A., Antinori, S., Colombo, M. C., Sampaolesi, R., Violin, M., de Pasquale, M. P., Moroni, L., Clementi, M., and Galli, M. (1997). Comparable biological and molecular determinants in HIV type 1-infected long-term non progressors and recently infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 337-341.
299. Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., and Ho, D. D. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection [see comments]. *N Engl J Med* 332(4), 201-8.
300. Mellors, J. W., Rinaldo Jr., C. R., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A., and Kingsley, L. A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272, 1167-1170.
301. Daar, E. S., Bai, J., Hausner, M. A., Majchrowicz, M., Tamaddon, M., and Giorgi, J. V. (1998). Acute HIV syndrome after discontinuation of antiretroviral therapy in a patient treated before seroconversion. *Ann Intern Med* 128(10), 827-9.
302. Munoz, A., Wang, M. C., Bass, S., Taylor, J. M., Kingsley, L. A., Chmiel, J. S., and Polk, B. F. (1989). Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am. J. Epidemiol.* 130(3), 530-539.
303. Ho, D. D. (1995). Time to hit HIV, early and hard [editorial; comment]. *N Engl J Med* 333(7), 450-1.
304. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., Kotler, D. P., and Fauci, A. S. (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease [see comments]. *Nature* 362(6418), 355-8.

305. Piatak, J. M., Saag, M. S., Yang, L. C., Clark, S. J., Kappes, J. C., Luk, K.-C., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Lifson, J. D. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259, 1749-1754.
306. Sinicco, A., Palestro, G., Caramello, P., Giacobbi, D., Giuliani, G., Paggi, G., Sciandra, M., and Gioannini, P. (1990). Acute HIV-1 infection: clinical and biological study of 12 patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3(3), 260-5.
307. Fauci, A. S. (1993). CD4+ T-lymphocytopenia without HIV infection--no lights, no camera, just facts [editorial; comment]. *N Engl J Med* 328(6), 429-31.
308. Haynes, B. F., Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1996). Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* 271, 324-327.
309. Schnittman, S. M., and Fauci, A. S. (1994). Human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome: an update. *Adv Intern Med* 39, 305-55.
310. Asjo, B., Albert, J., Karlsson, A., Morfeldt-Mamson, L., Biberfeld, G., Lidman, K., and Fenyo, E. M. (1986). Replicative properties of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* ii, 660-662.
311. Cheng-Mayer, C., Seto, C. D., Tateno, M., and Levy, J. A. (1988). Biologic features of HIV that correlate with virulence in the host. *Science* 240, 80-82.
312. Fenyo, E. M., Morfeldt, M. L., Chiodi, F., Lind, B., von, G. A., Albert, J., Olausson, E., and Asjo, B. (1988). Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol* 62(11), 4414-9.
313. Tersmette, M., De Goede, R., Winkel, I., Gruters, R., Guypers, H., Huisman, J., and Miedema, F. (1988). Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates : frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome. (AIDS) and AIDS-related. *J Virol* 62, 2026-2032.
314. Mackewicz, C., and Levy, J. A. (1992). CD8+ cell anti-HIV activity: nonlytic suppression of virus replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8(6), 1039-50.
315. Brown, A. E., Lane, J. R., Wagner, K. F., Zhou, S., Chung, R., Ray, K. L., Blatt, S. P., and Burke, D. S. (1995). Rates of p24 antigenemia and viral isolation in comparable white and black HIV-infected subjects. Military Medical Consortium for Applied Retroviral Research. *AIDS* 9(4), 325-8.
316. Binley, J. M., Klasse, P. J., Cao, Y., Jones, I., Markowitz, M., Ho, D. D., and Moore, J. P. (1997). Differential regulation of the antibody responses to Gag and Env proteins of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71(4), 2799-809.
317. Racz, P., Tenner-Racz, K., van Vloten, F., Schmidt, H., Dietrich, M., Gluckman, J. C., Letvin, N. L., and Janossy, G. (1990). Lymphatic tissue changes in AIDS and other retrovirus infections: tools and insights. *Lymphology* 23(2), 85-91.
318. Tenner-Racz, K., Racz, P., Dietrich, M., and Kern, P. (1985). Altered follicular dendritic cells and virus-like particles in AIDS and AIDS related lymphadenopathy. *Lancet* i, 105-106.
319. Henrard, D. R., Daar, E., Farzadegan, H., Clark, S. J., Phillips, J., Shaw, G. M., and Busch, M. P. (1995). Virologic and immunologic characterization of symptomatic and asymptomatic primary HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 9(3), 305-10.
320. Katzenstein, T. L., Pedersen, C., Nielsen, C., Lundgren, J. D., Jakobsen, P. H., and Gerstoft, J. (1996). Longitudinal serum HIV RNA quantification: correlation to viral phenotype at seroconversion and clinical outcome. *AIDS* 10(2), 167-73.
321. Mellors, J. W., Kingsley, L. A., Rinaldo Jr., C. R., Todd, J. A., Hoo, B. S., Kokka, R. P., and Gupta, P. (1995). Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann.Int.Med.* 122, 573-579.
322. O'Brien, W. A., Hartigan, P. M., Martin, D., Esinhart, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M. S., and Hamilton, J. D. (1996). Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N Engl J Med* 334(7), 426-31.
323. Schacker, T., Collier, A. C., Hughes, J., Shea, T., and Corey, L. (1996). Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 125(4), 257-64.
324. Jurriaans, S., Van, G. B., Weverling, G. J., Van, S. D., Nara, P., Coutinho, R., Koot, M., Schuitemaker, H., and Goudsmit, J. (1994). The natural history of HIV-1 infection: virus load and virus phenotype independent determinants of clinical course? *Virology* 204(1), 223-33.
325. Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V. A., Crown, S., Maerz, A., Sonza, S., Learmont, J., Sullivan, J. S., Cunningham, A., Dwyer, D., Dowton, D., and Mills, J. (1995). Genomic structure of an attenuated quaspecies of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270, 988-991.

326. Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (1995). Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection [see comments]. *N Engl J Med* 332(4), 228-32.
327. Sadora, D. L., Lee, F., Dailey, P. J., and Marx, P. A. (1998). A genetic and viral load analysis of the simian immunodeficiency virus during the acute phase in macaques inoculated by the vaginal route. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(2), 171-81.
328. Liu, S.-L., and al. (1997). Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: Human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J. Virol.* 71, 4284-4295.
329. Michael, N. L., Chang, G., Louie, L. G., Mascola, J. R., Dondero, D., Birx, D. L., and Sheppard, H. W. (1997). The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 3(3), 338-340.
330. Operskalski, E. A., Mosley, J. W., Busch, M. P., and Stram, D. O. (1997). Influences of age, viral load, and CD4+ count on the rate of progression of HIV-1 infection to AIDS. Transfusion Safety Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 15(3), 243-4.
331. Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., and O'Brien, S. J. (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science* 273, 1856-1862.
332. Garred, P., Eugen-Olsen, J., Iversen, A. K., Benfield, T. L., Svejgaard, A., and Hofmann, B. (1997). Dual effect of *CCR5* delta 32 gene deletion in HIV-1-infected patients. Copenhagen AIDS Study Group. *Lancet* 349(9069), 1884.
333. Huang, Y., Paxton, W. A., Wolinsky, S. M., Neumann, A. U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., Kunstman, K., Erickson, D., Dragon, E., Landau, N. R., Phair, J., and Ho, D. D. (1996). The role of a mutant *CCR5* allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 2, 1240-1243.
334. Kostrikis, L. G., Huang, Y., Moore, J. P., Wolinsky, S. M., Zhang, L., Guo, Y., Deutsch, L., Phair, J., Neumann, A. U., and Ho, D. D. (1998). A chemokine receptor *CCR2* allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a *CCR5* promoter mutation. *Nat. Med.* 4(3), 350-3.
335. Smith, M., and al, e. (1997). Contrasting genetic influence of *CCR2* and *CCR5* receptor gene variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 277, 959-965.
336. Winkler, C., Modi, W., Smith, M. W., Nelson, G. W., Wu, X., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Jacobson, L. P., Detels, R., Donfield, S., Willoghby, A., Goperts, W., Vlahov, D., Phair, J., Study, A., (HGDS), H. G. a. D. s., (MACS), M. A. C. S., (MHCS), M. H. C. S., (SFCC), S. F. C. C., and O'Brien, S. J. (1998). Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an *SDF-1* chemokine gene variant. *Science* 279, 389-393.
337. Saah, A. J., Munoz, A., Kuo, V., Fox, R., Kaslow, R. A., Phair, J. P., Rinaldo, C. R., Jr., Detels, R., and Polk, B. F. (1992). Predictors of the risk of development of acquired immunodeficiency syndrome within 24 months among gay men seropositive for human immunodeficiency virus type 1: a report from the Multicenter AIDS Cohort Study. *Am J Epidemiol* 135(10), 1147-55.
338. Burcham, J., Marmor, M., Dubin, N., Tindall, B., Cooper, D. A., Berry, G., and Penny, R. (1991). CD4% is the best predictor of development of AIDS in a cohort of HIV- infected homosexual men. *AIDS* 5(4), 365-72.
339. Phillips, A. N., Lee, C. A., Elford, J., Webster, A., Janosy, G., Griffiths, P. D., and Kernoff, P. B. (1991a). p24 antigenaemia, CD4 lymphocyte counts and the development of AIDS. *AIDS* 5(10), 1217-22.
340. Dapolito, G. A., Elkins, W. R., Loudon, W. T., Goldstein, S., Johnson, P. R., and Hirsch, V. M. (1993). Characterization of a pathogenic SIVagm isolate. *Nonhuman primate Models for AIDS Research Symposium (Abstract)*.
341. Centers for Disease Control. (1993). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescent and adults. *MMWR* 41((RR-17)), 1-19.
342. Fahey, J. L., Taylor, J. M., Detels, R., Hofmann, B., Melmed, R., Nishanian, P., and Giorgi, J. V. (1990). The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 322(3), 166-72.
343. Melmed, R. N., Taylor, J. M., Detels, R., Bozorgmehri, M., and Fahey, J. L. (1990). Serum neopterin changes in HIV-infected subjects: indicator of significant pathology, CD4 T cell changes, and the development of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2(70-6).
344. Reddy, M. M., Vodian, M., and Grieco, M. H. (1990). Elevated levels of CD4 antigen in sera of human immunodeficiency virus- infected populations. *J Clin Microbiol* 28(8), 1744-6.
345. Schellekens, P. T., Koot, M., Roos, M. T., Tersmette, M., and Miedema, F. (1994). Immunological and virological markers determining progression to AIDS. *Neth J Med* 45(6), 238-43.
346. Graham, B. S., and Wright, P. F. (1995). Candidate AIDS vaccines. *N Engl J Med* 333(20), 1331-9.

347. Godfried, M. H., van der Poll, T., Weverling, G. J., Mulder, J. W., Jansen, J., van Deventer, S. J., and Sauerwein, H. P. (1994). Soluble receptors for tumor necrosis factor as predictors of progression to AIDS in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 169(4), 739-45.
348. Bilello, J. A., Stellrecht, K., Drusano, G. L., and Stein, D. S. (1996). Soluble tumor necrosis factor-alpha receptor type II (sTNF alpha RII) correlates with human immunodeficiency virus (HIV) RNA copy number in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 173(2), 464-67.
349. Sheppard, H. W., Lang, W., Ascher, M. S., Vittinghoff, E., Anderson, R. E., and Winkelstein, W. (1993). The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *AIDS* 7, 1159-66.
350. Conners, R., Mohri, H., Cao, Y., and Ho, D. D. (1993). Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in Human Immunodeficiency Virus type 1-infected individuals. *J Virol* 67, 1772-77.
351. Lee, T. H., Sheppard, H. W., Reis, M., Dondero, D., Osmond, D., and Busch, M. P. (1994). Circulating HIV-1-infected cell burden from seroconversion to AIDS: importance of postseroconversion viral load on disease course. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7(4), 381-88.
352. Connor, R. I., and Ho, D. D. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* 68, 4400-08.
353. Romagnani, S., Maggi, E., and Del Prete, G. (1994). An alternative view of the Th1/Th2 switch hypothesis in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10(5), 3-9.
354. Tersmette, M., Gruters, R. A., de Wolf, F., de Goede, R. E. Y., Lange, J. M. A., Schellekens, P. T. A., Goudsmit, J., Huisman, H. G., and Miedema, F. (1989). Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 63, 2118-25.
355. Janvier, B., Mallet, F., Cheynet, V., Dalbon, P., Vernet, G., Besnier, J. M., Choutet, P., Goudeau, A., Mandrand, B., and Barin, F. (1993). Prevalence and persistence of antibody titers to recombinant HIV-1 core and matrix proteins in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6(8), 898-903.
356. Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Cohen, O. J., Demarest, J. F., Montefiori, D., Orenstein, J. M., Fox, C., Schragar, L. K., and et, a. (1995). Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection [see comments]. *N Engl J Med* 332(4), 209-16.
357. Cavacini, L. A., Emes, C. L., Power, J., Underdahl, J., Goldstein, R., Mayer, K., and Posner, M. R. (1993). Loss of serum antibodies to a conformational epitope of HIV-1/gp120 identified by a human monoclonal antibody is associated with disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6(10), 1093-102.
358. Pincus, S. H., Messer, K. G., Nara, P. L., Blattner, W. A., Colclough, G., and Reitz, M. (1994). Temporal analysis of the antibody response to HIV envelope protein in HIV-infected laboratory workers. *J Clin Invest* 93, 2505-13.
359. Homsy, J., Meyer, M., and Levy, J. A. (1990). Serum enhancement of human immunodeficiency virus (HIV) infection correlates with disease in HIV-infected individuals. *J Virol* 64(4), 1437-40.
360. Giorgi, J. V., Liu, Z., Hultin, L. E., Cumberland, W. G., Hennessey, K., and Detels, R. (1993). From the multicentre AIDS Cohort group: Elevated levels of CD38+ CD8+, the pronostic value of low CD4+ T cells levels: Results of 6 years of follow-up. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6, 904-12.
361. Ho, H. N., Hultin, L. E., Mitsuyasu, R. T., Matud, J. L., Hausner, M. A., Bockstone, D., Chou, C. C., O'Rourke, S., Taylor, J. M. G., and Giorgi, J. V. (1993). Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens. *J Immunol* 150, 3070-79.
362. Munoz, A., Vlahov, D., Solomon, L., Margolick, J. B., Baretta, J. C., Cohn, S., Astemborski, J., and Nelson, K. E. (1992). Prognostic indicators for development of AIDS among intravenous drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr* 5(7), 694-700.
363. Levy, J. A. (1994). Long-term survivors of HIV infection. *Hospital Practice* 29(10), 41-52.
364. Lifson, A., Buchbinder, S., Sheppard, H., Mawle, A., Wilber, J., Stanley, M., Hart, C., Hessol, N., and Holmberg, S. (1991). Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J Infect Dis* 163(5), 959-965.
365. Pantaleo, G., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Cohen, O. J., and Fauci, A. S. (1996). Antiviral immunity in HIV-1 infected long-term non-progressors (LTNPs). *Semin Virol* 7, 131-38.
366. Levy, J. A., Mackewicz, C. E., and Barker, E. (1996). Controlling HIV pathogenesis: the role of noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ cells. *Immunol Today* 17(5), 217-24.
367. Barker, E., Mackewicz, C. E., Reyes-Teran, G., Sato, A., Stranford, S. A., Fujimura, S. H., Christopherson, C., Chang, S.-H., and Levy, J. A. (1998). Virological and immunological features of long-term Human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to AIDS. *Blood* 92(9), 3105-14.

368. Huang, Y., Zhang, L., and Ho, D. D. (1995). Characterisation of *nef* sequences in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 1, 93-100.
369. Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (1995). Brief report: absence of intact *nef* sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 332(4), 228-32.
370. Learmont, J., Tindall, B., Evans, L., Cunningham, A., Cunningham, P., Wells, J., Penny, R., Kaldor, J., and Cooper, D. A. (1992). Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet* 340, 863-67.
371. Michael, N. L., Chang, G., d'Arcy, L. A., Ehrenberg, P. K., Mariani, R., Busch, M. P., Birx, D. L., and Schwartz, D. H. (1995). Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol* 69(7), 4228-36.
372. Schragar, L. J., Young, J. M., Fowler, M. G., Mathison, B. J., and Vermund, S. H. (1994). Long-term survivors of HIV-1 infection: Definitions and research challenges. *AIDS* 8, 95-98.
373. Mackewicz, C. E., Ortega, H. W., and Levy, J. A. (1991). CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest* 87(4), 1462-66.
374. Rosenberg, E. S., Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., Sax, P. E., Kalams, S. A., and Walker, B. D. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4+ T-cells responses associated with control of viremia. *Science* 278, 1447-50.
375. Letvin, N. L., and King, N. W. (1990). Immunologic and pathologic manifestations of the infection of rhesus macaques with SIVmac. *J. Acquir Immune Defic Syndr* 3, 1023-40.
376. Rosenberg, Z. F., and Fauci, A. (1989). The immunopathogenesis of HIV infection. *Adv. Immunol.* 47, 377-429.
377. Gigout, L., Vaslin, B., Matheux, F., Caufour, P., Neildez, O., Cheret, A., Lebel-Binay, S., Theodoro, F., Dilda, P., Benveniste, O., Clayette, P., Le Grand, R., and Dormont, D. (1998). Consequences of ddI-induced reduction of acute SIVmac251 virus load on cytokine profiles in cynomolgus macaques. *Res Virol* 149(6), 341-54.
378. Wyand, M. S., Ringler, D. J., Naidu, Y. M., Mattmuller, M., Chalifoux, L. V., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., Desrosiers, R. C., and King, N. W. (1989). Cellular localization of simian immunodeficiency virus in lymphoid tissues. II. In situ hybridization. *Am. J. Pathol.* 134, 385-93.
379. Chakrabarti, L., Cumont, M. C., Montagnier, L., and Hurtrel, B. (1994). Kinetics of primary SIV infection in lymph nodes. *J. Med. Primatol.* 23, 117-24.
380. Lackner, A. A. (1994). Pathology of simian immunodeficiency virus induced disease. *CurrTop Microbiol Immunol* 188, 35-76.
381. Veazey, R. S., DeMaria, M., Chalifoux, L. V., Shvets, D. E., Pauley, D. R., Knight, H. L., Rosenzweig, M., Johnson, R. P., Desrosiers, R. C., and Lackner, A. A. (1998). Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280(5362), 427-31.
382. Le Grand, R., Clayette, P., Noack, O., Vaslin, B., Théodoro, F., Michel, G., Roques, P., and Dormont, D. (1994). An animal model for antiretroviral therapy: effect of zidovudine on viral load during acute infection after exposure of macaques to simian immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1279-87.
383. Hirsch, V. M., Fuerst, T. R., Sutter, G., Carrol, M. W., Yang, L. C., Goldstein, S., Piatk Jr., M., Elkins, W. R., Alvord, W. G., Montefiori, D. C., Moss, B., and Lifson, J. D. (1996). Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus ankara. *J Virol* 70(6), 3741-52.
384. Lifson, J. D., Nowak, M. A., Goldstein, S., Rossio, J. L., Kinter, A., Vasquez, G., Wiltout, T. A., Brown, C., Schneider, D., Wahl, L., Lloyd, A. L., Williams, J., Elkins, W. R., Fauci, A. S., and Hirsch, V. M. (1997). The extent of early viral replication is a critical determinant of the natural history of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 71(12), 9508-14.
385. Staprans, S. I., Dailey, P. J., Rosenthal, A., Horton, C., Grant, R. M., Lerche, N., and Feinberg, M. B. (1999). Simian immunodeficiency virus disease course is predicted by the extent of virus replication during primary infection. *J Virol* 73, 4829-39.
386. Khatissian, E., Chakrabarti, L., and Hurtrel, B. (1996). Cytokine patterns and viral load in lymph nodes during the early stages of SIV infection. *Res Virol* 147(2-3), 181-9.
387. Cheret, A., Le Grand, R., Caufour, P., Dereuddre-Bosquet, N., Matheux, F., Neildez, O., Theodoro, F., Maestrals, N., Benveniste, O., Vaslin, B., and Dormont, D. (1996). Cytokine mRNA expression in mononuclear cells from different tissues during acute SIVmac251 infection of macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(13), 1263-72.
388. Cheret, A., Le Grand, R., Caufour, P., Neildez, O., Matheux, F., Theodoro, F., Vaslin, B., and Dormont, D. (1999). RANTES, IFN-gamma, CCR1, and CCR5 mRNA expression in peripheral blood, lymph node, and bronchoalveolar lavage mononuclear cells during primary simian immunodeficiency virus infection of macaques. *Virology* 255(2), 285-93.

389. Daniel, M. D., Letvin, N. L., King, N. W., Kannagi, M., Sehgal, P. K., Hunt, R. D., Kanki, P. J., Essex, M., and Desrosiers, R. C. (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* 228, 1201-1204.
390. Benveniste, R. E., Arthur, L., Tsai, C. C., Sowder, R., Copeland, T. D., Henderson, L. E., and Oroszlan, S. (1986). Isolation of a lentivirus from a macaque with lymphoma : comparison with HTLV-III/LAV and other lentiviruses. *J. Virol.* 60, 483-90.
391. Gardner, M. B., and Luciw, P. (1988). Simian immunodeficiency viruses and their relationship to the human immunodeficiency viruses. *AIDS* 2, S3-10.
392. Desrosiers, R. C. (1988). Simian Immunodeficiency viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 42, 607-25.
393. Murphey-Corb, M., Martin, L. N., Rangan, S. R. S., Baskin, G. B., Gormus, B. J., Wolf, R. H., Andes, W. A., West, M., and Montelaro, R. C. (1986). Isolation of an HTLV-III - related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys. *Nature (London)* 321, 435-37.
394. Traina-Dorge, V., Blanchard, J., Martin, L., and Murphey-Corb, M. (1992). Immunodeficiency and lymphoproliferative disease in an African Green monkey dually infected with SIV and STLV-I. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8, 97-100.
395. Reimann, K. A., Tenner-Racz, K., Racz, P., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Lin, W., Ransil, B. J., and Letvin, N. L. (1994). Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J. Virol.* 68, 2362-70.
396. Kindt, T. J., Hirsch, V. M., Johnson, P. R., and Sawasdikosol, S. (1992). Animal models for acquired immunodeficiency syndrome. *Adv Immunol* 52, 425-74.
397. Yasutomi, Y., Reinmann, K., Lord, C., Miller, M., and Letvin, N. (1993). Simian immunodeficiency virus-specific CD8+ lymphocyte response in acutely infected rhesus monkeys. *J Virol* 67, 1707-11.
398. Baskin, G., Martin, L. N., Murphey-Corb, M., H, F.-S., Kuebler, D., and Davison, B. (1995). Distribution of SIV in lymph nodes of serially sacrificed rhesus monkeys. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11, 273-85.
399. Chakrabarti, L., Hurtrel, M., Maire, M.-A., Vazeux, R., Dormont, D., Montagnier, L., and Hurtrel, B. (1991). Early viral replication in the brain of SIV-infected rhesus monkeys. *Am. J. Pathol.* 139, 1273-80.
400. Koralknik, I. J., Gessain, A., Klotman, M. E., Lo Monaco, A., and Berneman, Z. N. (1992). Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8813-17.
401. Schmitz, J., Kuroda, M., Santra, S., Sasseville, V., Simon, M., Lifton, M., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B., Ghayeb, J., Forman, M., Montefiori, D., Rieber, E., Letvin, N., and Reimann, K. (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283, 857-60.
402. Mohri, H., Bonhoeffer, S., Monard, S., Perelson, A. S., and Ho, D. D. (1998). Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science* 279, 1223-7.
403. Rosenzweig, M., DeMaria, M. A., Harper, D. M., Friedrich, S., Jain, R. K., and Johnson, R. P. (1998). Increased rates of CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte turnover in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6388-93.
404. Dittmer, U., Lüke, W., Stahl-henning, C., Coulibaly, C., Petry, H., Bodemer, W., Hunsmann, G., and Voss, G. (1994). Early helper T-cell dysfunction in simian immunodeficiency virus but not in human immunodeficiency virus type-2 infected macaques. *J. Med. Primatol.* 23, 298-303.
405. Estaquier, J., Idziorek, T., De Bels, F., Barré-Sinoussi, F., Hurtrel, B., Aubertin, A.-M., Venet, A., Mehtali, M., Muchmore, E., Michel, P., Mouton, Y., Girard, M., and Ameisen, J.-C. (1994). Programmed cell death and AIDS : significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9431-35.
406. McClure, H. M., Anderson, D. C., Fultz, P. N., Ansari, A. A., Lockwood, E., and Brodie, A. (1989). Spectrum of disease in macaque monkeys chronically infected with SIV/SMM. *Vet Immunol Immunopathol* 21, 13-24.
407. Ward, J. M., O'Leary, T. J., Baskin, G. B., Benveniste, R., Harris, C. A., Nara, P. L., and Rhodes, R. H. (1987). Immunohistochemical localization of human and simian immunodeficiency viral antigens in fixed tissue section. *Am. J. Pathol.* 127, 199-205.
408. Ringler, D. J., Wyand, M. S., Walsh, D. G., MacKey, J. J., Chalifoux, L. V., Popovic, M., Minassian, A. A., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., Desrosiers, R. C., and King, N. W. (1989). Cellular localization of simian immunodeficiency virus in lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* 134, 373-83.
409. Letvin, N. L., Daniel, M. D., Sehgal, P. K., Desrosiers, R. C., Hunt, R. D., Waldron, L. M., MacKey, J. J., Schmidt, D. K., Chalifoux, L. V., and King, N. W. (1985). Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* 230, 71-73.
410. Benveniste, R. E., Morton, W. R., Clark, E. A., Tsai, C. C., Ocks, H. D., Ward, J. M., Kuller, L., Knott, W. B., Hill, R. W., Gale, M. J., and Thouless, M. E. (1988). Inoculation of baboons and macaques with simian

- immunodeficiency virus/Mne, a primate lentivirus closely related to human immunodeficiency virus type 2. *J. Virol.* 62, 2091-101.
411. Morton, W. R., Kuller, L., Benveniste, R. E., Clark, E. A., Tsai, C. C., Gale, M. J., Thouless, M. E., Overbaugh, J., and Katze, M. G. (1989). Transmission of the simian immunodeficiency virus SIVmne in macaques and baboons. *J Med Primatol* 18, 237-45.
412. Kodama, T., Shiigi, S., Baldwin, C., and Axthelm, M. (1996). *Retroviruses, Cold Spring Harbour, NY, USA.*
413. Chakrabarti, L., Baptiste, V., Khatissian, E., Cumont, M. C., Aubertin, A. M., Montagnier, L., and Hurtrel, B. (1995). Limited viral spread and rapid immune response in lymph nodes of macaques inoculated with attenuated simian immunodeficiency virus. *Virology* 213, 535-548.
414. Caufour, P., Le Grand, R., Cheret, A., Neildez, O., Theodoro, F., Boson, B., Vaslin, B., and Dormont, D. (1999). Secretion of beta-chemokines by bronchoalveolar lavage cells during primary infection of macaques inoculated with attenuated nef-deleted or pathogenic simian immunodeficiency virus strain mac251. *J Gen Virol* 80, 767-76.
415. Johnson, R. P., and Desrosiers, R. C. (1998). Protective immunity induced by live attenuated simian immunodeficiency virus. *Curr Opin Immunol* 10, 436-43.
416. Morrow, W. J. W., Homsy, J., Eichberg, J. W., and al. (1989). Long-term observation of baboons, rhesus monkeys, and chimpanzees inoculated with HIV and given periodic immunosuppressive treatment. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5, 233-45.
417. McClure, M. O., Sattentau, Q. J., Beverley, P. C., Hearn, J. P., Fitzgerald, A. K., Zuckerman, A. J., and Weiss, R. A. (1987). HIV infection of primate lymphocytes and conservation of the CD4 receptor. *Nature* 330, 487-9.
418. Gartner, S., Liu, Y., Polonis, V., Lewis, M. G., Elkins, W. R., Hunter, E. A., Miao, J., Cortis, K. J., and Eddy, G. A. (1994). Adaptation of HIV-1 to pigtailed macaques. *J. Med. Primatol.* 23, 155-163.
419. Otten, R. A., Brown, B. G., Simon, M., Davis Lupo, L., Parekh, B. S., Lairmore, M. D., Schable, C. A., Schochetman, G., and Rayfield, M. A. (1994). Differential replication and pathogenic effects of HIV-1 and HIV-2 in macaca nemestrina. *AIDS* 8, 297-306.
420. Agy, M. B., Schmidt, A., Florey, M. J., Kennedy, B. J., Schaefer, G., Katze, M. G., Corey, L., Morton, W. R., and Bosch, M. L. (1997). Serial in vivo passage of HIV-1 infection in Macaca nemestrina. *Virology* 238, 336-43.
421. Kent, K. A. (1995). Neutralising epitopes of simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Med Primato* 24(3), 145-9.
422. Kent, S. J., Woodward, A., and Zhao, A. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cell responses correlate with control of acute HIV-1 infection in macaques. *J Infect Dis* 176, 1188-97.
423. Dormont, D., Livartowski, J., Chamaret, S., and et, a. (1989). HIV-2 in rhesus monkeys : serological, virological and clinical reults. *Intervirology* 30 (suppl 1), 59-65.
424. Zhang, Y. J., Putkonen, P., Albert, J., Öhman, P., Biberfeld, G., and Fenyö, E. M. (1994). Stable biological and antigenic characteristics of HIV-1SBL6669 in nonpathogenic infection of macaques. *Virology* 200, 583-89.
425. McClure, J., Scheibel, M., Steele, J., Dorofeeva, N., Schmidt, A., Hu, S.-L., and Morton, W. (1994). HIV-2 macaque model for HIV infection and pathogenesis. *J. Med. Primatol.* 23, 243.
426. Wakrim, L., Nicol, I., LeGrand, R., Boussin, F., Vaslin, B., Roques, P., and Dormont, D. (1994). Adaptation of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) primary isolates to the in vivo replication in macaque. *J. Med. Primatol.* 23, 244.
427. Morton, W. R., McClure, J., Schmidt, A., Kuller, M., Gale, M., and Hu, S. L. (1990). *8th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS., New Orleans, Louisiana, USA.*
428. Lewis, M., Zack, P. M., Elkins, W. R., and Jahrling, P. B. (1992). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8, 1631-39.
429. Courgnaud, V., Lauré, F., Fultz, P. N., Montagnier, L., Bréchet, C., and Sonigo, P. (1992). Genetic differences accounting for evolution and pathogenicity of simian immunodeficiency virus from sooty mangabey monkey after cross-species transmission to a pig-tailed macaque. *J. Virol.* 66, 414-19.
430. Honjo, S., Narita, T., Kobayashi, R., Hiyaoka, A., Fujimoto, K., Takasaka, M., Sakakibara, I., Mukai, R., Ishikawa, K., Ohta, Y., and Hayami, M. (1990). Experimental infection of African Green Monkeys and cynomolgus monkeys with a SIVagm strain isolated from a healthy African Green Monkey. *J. Med. Primatol.* 19, 9-20.
431. Johnson, P. R., Goldstein, S., London, W. T., Fomsgaard, A., and Hirsch, V. M. (1990). Molecular clones of SIVsm and SIVagm: Experimental infection of macaques and African green monkeys. *J. Med. Primatol.* 19, 279-286.
432. Barnett, S. W., Murthy, K. K., Herndier, B. G., and Levy, J. A. (1994). An AIDS-like condition induced in baboons by HIV-2. *Science* 266, 642-46.

433. Sakuragi, S., Shibata, R., Mukai, R., Komatsu, T., Fukasawa, M., Sakai, H., Sakuragi, J.-i., Kawamura, M., Ibuki, K., Hayami, M., and Adachi, A. (1992). Infection of macaque monkeys with a chimeric human and simian immunodeficiency. *J. Gen. Virol.* 73, 2983-87.
434. Dunn, C. S., Beyer, C., Kieny, M. P., Gloeckler, L., Schmitt, D., Gut, J. P., Kirn, A., and Aubertin, A. M. (1996). High viral load and CD4 lymphopenia in rhesus and cynomolgus macaques infected by a chimeric primate lentivirus constructed using the env, rev, tat, and vpu genes from HIV-1 Lai. *Virology* 223, 351-61.
435. Li, M. S., Garcia, A. G., Bhattacharyya, U., Mascagni, P., Austen, B. M., and Roberts, M. M. (1996). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to nucleocapsid protein p7 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 218, 352-5.
436. Ranjbar, S., Jones, S., Stott, E. J., and Almond, N. (1997). The construction and evaluation of SIV/HIV chimeras that express the envelope of European HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13, 797-800.
437. Lu, Y., Brosio, P., Lafaille, M., Li, J., Collman, R. G., Sodroski, J., and Miller, C. J. (1996). Vaginal transmission of chimeric simian/human immunodeficiency viruses in rhesus macaques. *J Virol* 70, 3045-50.
438. Chackerian, B., Michelle Long, E., Luciw, P. A., and Overbaugh, J. (1997). Human Immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 71, 3932-39.
439. Kimball, L. E., and Bosch, M. L. (1998). In vitro HIV-1 infection in *Macaca nemestrina* PBMCs is blocked at a step beyond reverse transcription. *J Med Primatol* 27, 99-103.
440. Mandell, C. P., Jain, N. C., Miller, C. J., and Dandekar, S. (1995). Bone Marrow Monocyte/Macrophages Are an Early Cellular Target of Pathogenic and Nonpathogenic Isolates of Simian Immunodeficiency Virus (SIVmac) in Rhesus Macaques. *Lab. Invest.* 72, 323-33.
441. Igarashi, T., Kuwata, T., Yamamoto, H., Moriyama, H., Ui, M., Miyazaki, Y., and Hayami, M. (1998). Infectivity and immunogenicity of SIVmac/HIV-1 chimeric viruses (SHIVs) with deletions in two or three genes (vpr, nef and vpx). *Microbiol Immunol* 42, 71-4.
442. McCormick-Davis, C., Zhao, L. J., Mukherjee, S., Leung, K., Sheffer, D., Joag, S. V., Narayan, O., and Stephens, E. B. (1998). Chronology of genetic changes in the vpu, env, and Nef genes of chimeric simian-human immunodeficiency virus (strain HXB2) during acquisition of virulence for pig-tailed macaques. *Virology* 248, 275-83.
443. Luciw, P. A., Pratt-Lowe, E., Shaw, K. E., Levy, J. A., and Cheng-Mayer, C. (1995). Persistent infection of rhesus macaques with T-cell-line-tropic and macrophage-tropic clones of simian/human immunodeficiency viruses (SHIV). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7490-4.
444. Joag, S. V., Li, Z., Foresman, L., Stephens, E. B., Zhao, L. J., Adany, I., Pinson, D. M., McClure, H. M., and Narayan, O. (1996). Chimeric simian/human immunodeficiency virus that causes progressive loss of CD4+ T cells and AIDS in pig-tailed macaques. *J Virol* 70, 3189-97.
445. Joag, S. V., Li, Z., Foresman, L., Pinson, D. M., Raghavan, R., Zhuge, W., Adany, I., Wang, C., Jia, F., Sheffer, D., Ranchalis, J., Watson, A., and Narayan, O. (1997). Characterization of the pathogenic KU-SHIV model of acquired immunodeficiency syndrome in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13, 635-45.
446. Stephens, E. B., Joag, S. V., Atkinson, B., Sahni, M., Li, Z., Foresman, L., Adany, I., and Narayan, O. (1997). Infected macaques that controlled replication of SIVmac or nonpathogenic SHIV developed sterilizing resistance against pathogenic SHIV(KU-1). *Virology* 234, 328-39.
447. Reimann, K. A., Li, J. T., Voss, G., Lekutis, C., Tennerracz, K., Racz, P., Lin, W. Y., Montefiori, D. C., Leeparritz, D. E., Lu, Y. C., Collman, R. G., Sodroski, J., and Letvin, N. L. (1996). An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J Virol* 70, 3198-206.
448. Cayabyab, M., Karlsson, G. B., Etemad-Moghadam, B. A., Hofmann, W., Steenbeke, T., Halloran, M., Fanton, J. W., Axthelm, M. K., Letvin, N. L., and Sodroski, J. G. (1999). Changes in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins responsible for the pathogenicity of a multiply passaged simian-human immunodeficiency virus (SHIV-HXBc2). *J Virol* 73, 976-84.
449. Peeters, M., Janssens, W., Vanden Haesevelde, M., Franssen, K., Willems, B., Heyndrickx, L., Kestens, L., Piot, P., Van der Groen, G., and Heeney, J. (1995). Virologic and serologic characteristics of a natural chimpanzee lentivirus infection. *Virology* 211, 312-5.
450. Koopman, G., Haaksma, A. G. M., Ten Velden, J., Hack, E., and Heeney, J. L. (1999). The relative resistance of HIV-1-infected chimpanzees to AIDS correlates with the maintenance of follicular architecture and the absence of infiltration by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15, 365-73.
451. Nara, P., Hatch, W., Kessler, J., Kelliher, J., and Carter, S. (1989). The biology of human immunodeficiency virus-1 IIB infection in chimpanzee: in vivo and in vitro correlations. *J. Med. Primatol.* 18, 343-55.
452. Kraus, G., Werner, A., Baier, M., Binninger, D., Ferdinand, F. J., Norley, S., and Kurth, R. (1989). Isolation of human immunodeficiency viruses from African Green monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2892-96.



453. Wei, Q., and Fultz, P. N. (1998). Extensive diversification of human immunodeficiency virus type 1 subtype B strains during dual infection of a chimpanzee that progressed to AIDS. *J Virol* 72, 3005-17.
454. Novembre, F. J., J., d. R., Nidtha, S., O'Neil, S. P., Gibson, T. R., Evans-Strickfaden, T., Hart, C. E., and McClure, H. M. (2001). Rapid CD4+ T-cell loss induced by human immunodeficiency virus type 1(NC) in uninfected and reviously infected chimpanzees. *J. Virol.* 75, 1533-9.
455. Goudsmit, J., Smit, L., Krone, W. J. A., and al. (1987). IgG response to human immunodeficiency virus in experimentally infected chimpanzees mimics the IgG response in humans. *J. Infect. Dis.* 155, 327-31.
456. Goudsmit, J., Debouck, C., Meloen, R. H., and al. (1988). Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4478-82.
457. Nara, P. L., Robey, W. G., Arthur, L. O., and al. (1987). Persistent infection of chimpanzees with human immunodeficiency virus: serological responses and properties of reisolated viruses. *J. Virol.* 61, 3173-80.
458. Saksela, K., Muchmore, E., Girard, M., Fultz, P., and Baltimore, D. (1993). High viral load in lymph nodes and latent human immunodeficiency virus (HIV) in peripheral blood cells of HIV-1-infected Chimpanzees. *J. Virol.* 67, 7423-27.
459. Di Rienzo, A. M., Furlini, G., Olivier, R., Ferris, S., Heeney, J., and Montagnier, L. (1994). Different proliferative response of human and chimpanzee lymphocytes after contact with human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Eur. J. Immunol.* 24, 34-40.
460. Eichberg, J. W., Zarling, J. M., Alter, H. J., and al. (1987). T-cell responses to human immunodeficiency virus (HIV) and its recombinant antigens in HIV-infected chimpanzees. *J. Virol.* 61, 3804-08.
461. Castro, B. A., Walker, C. M., Eichberg, J. W., and Levy, J. A. (1991). Suppression of human immunodeficiency virus replication by CD8+ cells from infected and uninfected chimpanzees. *Cell. Immunol.* 132, 246-55.
462. Gougeon, M.-L., Garcia, S., Heeney, J., Tschopp, R., Lecoœur, H., Guélard, D., Rame, V., Dauguet, C., and Montagnier, L. (1993). Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9, 553-63.
463. Gougeon, M.-L., Lecoœur, H., Boudet, F., Ledru, E., Marzabal, S., S., B., Roue, R., Nagata, S., and Heeney, J. (1997). Lack of chronic immune activation in HIV-infected chimpanzees correlates with the resistance of T-cells to Fas/Apo-1 (CD95)-induced apoptosis and preservation of a T helper 1 phenotype. *J. Immunol.* 158, 2964-76.
464. Schuitemaker, H., Meyaard, L., Kootstra, N. A., Dubbes, R., Otto, S. A., Tersmette, M., Heeney, J. L., and Miedema, F. (1993). Lack of T-cell dysfunction and programmed cell death in human immunodeficiency virus type 1-infected chimpanzees correlates with absence of monocytotropic variants. *J. Infect. Dis.* 168, 1140-47.
465. Davis, I. C., Girard, M., and Fultz, P. N. (1998). Loss of CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 1-infected chimpanzees is associated with increased lymphocyte apoptosis. *J Virol* 72, 4623-32.
466. Gendelman, H. E., Ehrlich, G. D., Baca, L. M., Conley, S., Ribas, J., Kalter, C. D., Meltzer, M. S., Poiesz, B. J., and Nara, P. (1991). The inability of human immunodeficiency virus to infect chimpanzee monocytes can be overcome by serial viral passage in vivo. *J Virol.* 65, 3853-63.
467. Watanabe, M., Ringler, D. J., Fultz, P. N., MacKey, J. J., Boyson, J. E., Levine, C. G., and Letvin, N. L. (1991). A chimpanzee-passaged human immunodeficiency virus isolate is cytopathic for chimpanzee cells but does not induce disease. *J Virol* 65, 3344-8.
468. Camerini, D., and Seed, B. (1990). CD4 domain important for HIV-mediated syncytium formation lies outside the virus binding site. *Cell* 60, 747-54.
469. Zarling, J. M., Ledbetter, J. A., Sias, J., and al. (1990). HIV-infected humans, but not chimpanzees, have circulating cytotoxic T lymphocytes that lyse uninfected CD4+ cells. *J. Immunol.* 144, 2992-98.
470. Arthur, L. O., Bess, J. W., Jr., Waters, D. J., Pyle, S. W., Kelliher, J. C., Nara, P. L., Krohn, K., Robey, W. G., Langlois, A. J., Gallo, R. C., and et al. (1989). Challenge of chimpanzees (*Pan troglodytes*) immunized with human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *J Virol* 63, 5046-53.
471. Fultz, P. N., Nara, P., Barré-Sinoussi, F., Chaput, A., Greenberg, M. L., Muchmore, E., Kiény, M. P., and Girard, M. (1992). Vaccine protection of chimpanzees against challenge with HIV-1 infected peripheral blood mononuclear cells. *Science* 256, 1687-90.
472. Kanki, P. J., Alroy, J., and Essex, M. (1985). Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-III/LAV from wild-caught African green monkeys. *Science* 230, 951-4.
473. Goldstein, S., Elkins, W. R., and Hirsch, V. M. (1994). Tissue distribution and viral load in an African green monkey naturally infected with SIVagm. *J. Med. Primatol.* 23, 243.
474. Ennen, J., Findekle, H., Dittmar, M. T., Norley, S., Ernst, M., and Kurth, R. (1994). CD8+ T lymphocytes of African green monkeys secrete an immunodeficiency virus-suppressing lymphokine. *Proc. Natl. Sci. USA* 91, 7207-11.

475. Kornfeld, C., Pandrea, I., Diop, O. M., Gueye, A., Apetrei, C., Faye, A., Poaty Mavoungou, V., Rouquet, P., Onanga, R., Fair, J., Legrand, R., Roques, P., Simon, F., Barré-Sinoussi, F., and Müller-Trutwin, M. C. (2001). *8th annual HIV dynamics and evolution meeting, Paris, France.*
476. Norley, S. G., Kraus, G., Ennen, J., Bonilla, J., König, H., and Kurth, R. (1990). Immunological studies of the basis for the apathogenicity of simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9067-71.
477. Norley, S. G., Mikschy, U., Werner, A., Staszewski, S., Helm, E. B., and Kurth, R. (1990). Demonstration of cross-reactive antibodies able to elicit lysis of both HIV-1- and HIV-2-infected cells. *J Immunol* 145, 1700-5.
478. Allan, J. S., Strauss, J., and Buck, D. W. (1990). Enhancement of SIV infection with soluble receptor molecules. *Science* 247, 1084-7.
479. Werner, A., Winkowsky, G., and Kurth, R. (1990). Soluble CD4 enhances simian immunodeficiency virus SIVagm infection. *J Virol* 64, 6252-6.
480. Allan, J. S., Whitehead, E., Strout, K., Dunham, R., and Kanda, P. (1992). Cryptic neutralizing epitopes on SIVagm gp120; role in viral entry. *10th Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, San Juan*, 12.
481. Rappocciolo, G., Allan, J. S., Eichberg, J. W., and Chanh, T. C. (1992). A comparative study of natural killer activity, lymphoproliferation and cell phenotypes in non human primates. *Vet. Pathol.* 29, 53-9.
482. Norley, S. G. (1996). SIVagm infection of its natural African green monkey host. *Immunol Lett* 51, 53-8.
483. Fomsgaard, A., Johnson, P. R., Nielsen, C., Novembre, F. J., Goldstein, S., and Hirsch, V. M. (1994). Infectivity of SIVsm, SIVsmmPBj, SIVagm, and HIV-1 for Human and macaque cell-lines expressing nonhuman primate CD4 chimeras. *J. Med. Primatol.* 23, 246.
484. Hartung, S., Boller, K., Cichutek, K., Norley, S. G., and Kurth, R. (1992). Quantitation of a lentivirus in its natural host : simian immunodeficiency virus in African Green Monkeys. *J. Virol.* 66, 2143-49.
485. Müller, M. C., Corbet, S., Dias Tavares, M., Herve, V., Nerrienet, E., Georges-Courbot, M.-C., Saurin, W., Sonigo, P., and Barré-Sinoussi, F. (1995). *Meeting of the Laboratory of Tumor Cell Biology, Bethesda, Maryland, USA.*
486. Beer, B., Scherer, J., Megede, J., Norley, S., Baier, M., and Kurth, R. (1996). Lack of dichotomy between virus load of peripheral blood and lymph nodes during long term simian immunodeficiency virus infection of African green monkeys. *Virology* 219, 367-75.
487. Walker, C. M., and Levy, J. A. (1989). A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication. *Immunology* 66, 628-30.
488. Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P., and Levy, J. A. (1986). CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 234, 1563-66.
489. Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., and 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, 1811-5.
490. Goldstein, S., Ourmanov, I., Brown, C. R., Beer, B. E., Elkins, W. R., Plishka, R., Buckler-White, A., and Hirsch, V. M. (2000). Wide range of viral load in healthy african green monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus. *J Virol* 74, 11744-53.
491. Broussard, S. R., Staprans, S. I., White, R., Whitehead, E. M., Feinberg, M. B., and Allan, J. S. (2001). Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J Virol* 75, 2262-75.
492. Fultz, P. N. (1991). Replication of an acutely lethal simian immunodeficiency virus activates and induces proliferation of lymphocytes. *J. Virol.* 65, 4902-09.
493. Yehuda-Cohen, T., Powell, J. D., Villinger, F., McClure, H. M., Sell, K. W., and Ahmed-Ansari, A. (1990). Comparison of SIV/SMM replication in CD4+ T cell and monocyte/macrophage cultures from rhesus macaques and sooty mangabeys. *J Med Primatol* 19, 251-67.
494. Villinger, F., Folks, T. M., Lauro, S., Powell, J. D., Sundstrom, J. B., Mayne, A., and Ansari, A. A. (1996). Immunological and virological studies of natural SIV infection of disease-resistant nonhuman primates. *Immunol Lett* 51, 59-68.
495. Ahmed-Ansari, A., Powell, J. D., Jensen, P. E., Yehuda-Cohen, T., McClure, H. M., Anderson, D., Fultz, P. N., and Sell, K. W. (1990). Requirements for simian immunodeficiency virus antigen-specific in vitro proliferation of T cells from infected rhesus macaques and sooty mangabeys. *AIDS* 4, 399-407.
496. Chakrabarti, L. A., Lewin, S. R., Zhang, L., Gettie, A., Luckay, A., Martin, L. N., Skulsky, E., Ho, D. D., Cheng-Mayer, C., and Marx, P. A. (2000). Age-dependant changes in T cell homeostasis and SIV load in sooty mangabeys. *J. Med. Primatol.* 29, 158-165.
497. Powell, J. D., Yehuda-Cohen, T., Villinger, F., McClure, H. M., Sell, K. W., and Ahmed-Ansari, A. (1990). Inhibition of SIV/SMM replication in vitro by CD8+ cells from SIV/SMM infected seropositive clinically asymptomatic sooty mangabeys. *J Med Primatol* 19(3-4), 239-49.

498. Powell, J. D., McClure, H. M., Anderson, D., Fultz, P. N., Sell, K. W., and Ahmed-Ansari, A. (1989). Phenotypic and functional differences in NK and LAK cells in the peripheral blood of sooty mangabeys and rhesus macaques. *Cell Immunol* 124, 107-18.
499. Bosch, M. L., Pedersen, N., Amerongen, G. v., Reay, E., Marthas, M., Rose, T., Frankenhuis, M., and Osterhaus, A. D. M. E. (1994). Identification and partial characterization of a lentivirus from talapoin monkeys. *J. Med. Primatol.* 23, 233.
500. Marx, P. A., and Chen, Z. (1998). The function of simian chemokine receptors in the replication of SIV. *Semin. Immunol.* 10, 215-23.
501. Levy, J. A. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 57, 183-289.
502. Nkowane, B. M. (1991). Prevalence and incidence of HIV infection in Africa: a review of data published in 1990. *AIDS* 5, 7-16.
503. WHO. (1995). AIDS 4, Global Data. *Weekly Epidemiol. Rec.* 70, 5-12.
504. Cameron, P., Pope, M., Granelli-Piperno, A., and Steinman, R. M. (1996). Dendritic cells and the replication of HIV-1. *J. Leucocyte Biol.* 59, 158-171.
505. Cameron, P. U., Forsum, U., Tepler, H., Granelli-Piperno, A., and Steinman, R. M. (1992). During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion. *Clin. Exp. Immunol.* 88, 226-36.
506. Soto-Ramirez, L. E., Renjifo, B., McLane, M. F., Marlonk, R., O'Hara, C., Sutthent, R., Wasi, C., Vithayasai, P., Vithayasai, V., Apichartpiyakul, C., Auewarakyl, P., Pena Cruz, V., Chi, D.-S., Osathanondh, R., Mayer, K., Lee, T.-H., and Essex, M. (1996). HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 271, 1291-93.
507. Spira, A., Marx, P., Patterson, B., Mahoney, J., Koup, R., Wolinsky, S., and Ho, D. (1996). Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 183, 215-25.
508. Hirsch, V., Campbell, B., Bailes, E., Goeken, R., R, B. C., Axthelm, M., Murphey-Corb, M., and Sharp, P. M. (1998). Pathogenesis of SIV from the hoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*) for macaques. *16th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS*, 5.
509. Spiegel, H., Berbst, H., Niedobitek, G., and al., e. (1992). Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *Am. J. Pathol.* 140, 15-22.
510. Zhu, T., Mo, H., Wang, N., Nam, D. S., Cao, Y., Koup, R. A., and Ho, D. D. (1993). Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. *Science* 261, 1179-81.
511. Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., Lapham, C. K., Klaus-Kovtun, V., Mostowski, H., Manischewitz, J., and Golding, H. (1997). Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 3, 1369-75.
512. Blauvelt, A. (1997). The role of skin dendritic cells in the initiation of HIV infection. *Am. J. Med.* 102, 16-20.
513. Weissman, D., Rabin, R. L., Arthos, J., Rubbert, A., Dybul, M., Swofford, R., Venkatesan, S., Farber, J. M., and Fauci, A. S. (1997). Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature* 389, 981-84.
514. Patterson, B. K., Landay, A., Andersson, J., Brown, C., Behbahani, H., Jiyamapa, D., Burki, Z., Stanlaslawski, D., Czerniewski, M. A., and Garcia, P. (1998). Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission. *Am. J. Pathol.* 153, 481-90.
515. Zhang, L., He, T., Talal, A., Wang, G., Frankel, S. S., and Ho, D. D. (1998). *In vivo* distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3 and CCR5. *J. Virol.* 72, 5035-45.
516. Fox, C. H., Tenner-Racz, K., Racz, P., Firpo, A., Pizzo, P. A., and Fauci, A. S. (1991). Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Infect. Dis.* 164, 1051-57.
517. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Cohen, O. J., Vaccarezza, M., Muro-Cacho, C., and Fauci, A. S. (1994). Role of lymphoid organs in the pathogenesis of Human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol. Rev.* 140, 105-130.
518. Tacchetti, C., Favre, A., Moresco, L., Meszaros, P., Luzzi, P., Truini, M., Rizzo, F., Grossi, C. E., and Ciccone, E. (1997). HIV is trapped and masked in the cytoplasm of lymph node follicular dendritic cells. *Am. J. Pathol.* 150, 533-42.
519. Tenner-Racz, K., Racz, P., Thomé, C., Meyer, C. G., Anderson, P. J., Schlossman, S. F., and Letvin, N. (1993). Cytotoxic effector cell granules recognized by the monoclonal antibody TIA-1 are present in CD8+ lymphocytes in lymph nodes of human immunodeficiency virus-1 infected patients. *Am. J. Pathol.* 142, 1750-8.
520. Wood, G. S., Garcia, C. F., Dorfman, L. F., and Warnke, R. A. (1985). The immunohistology of follicle lysis in lymph nodes biopsies from homosexual men. *Blood* 66, 1092-7.

521. Spiegel, H., Herbst, H., Niedobitek, G., Foss, H. D., and Stein, H. (1992). Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *Am J Pathol* 140, 15-22.
522. Tenner-Racz, K., Stellbrink, H.-J., van Lunzen, J., Schneider, C., Jacobs, J.-P., Raschdorff, B., Großschupf, G., Steinman, R. M., and Racz, P. (1998). The unenlarged lymph nodes of HIV-infected asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.* 187, 949-59.
523. Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., and Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271, 1582-6.
524. Stanley, S. K., McCune, J. M., Kaneshima, H., Justement, J. S., Sullivan, M., Boone, E., baserl, M., Adelsberger, M., Bonyhadi, M., Orenstein, J., Fox, C., and Fauci, A. S. (1993). Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *J. Exp. Med.* 178, 1151-63.
525. Haynes, B. F., Hale, L. P., Weinhold, K. J., Patel, D. D., Liao, H. X., Bressler, P. B., Jones, D. M., Demarest, J. F., Gebhard-Mitchell, K., Haase, A. T., and Bartlett, J. A. (1999). Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* 103, 921.
526. Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., Polis, M. A., Haase, A. T., Feinberg, M. B., Sullivan, J. L., Jamieson, B. D., Zack, J. A., Picker, L. J., and Koup, R. A. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396, 690-5.
527. Fleury, S., de Boer, R. J., Rizzardi, G. P., Wolthers, K. C., Otto, S. A., Welbon, C. C., Graziosi, C., Knabenhans, C., Soudeyns, H., Bart, P. A., Gallant, S., Corpataux, J. M., Gillet, M., Meylan, P., Schnyder, P., Meuwly, J. Y., Spreen, W., Glauser, M. P., Miedema, F., and Pantaleo, G. (1998). Limited CD4+ T cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat. Med.* 4, 794-801.
528. Hellerstein, M., Hanley, M. B., Cesar, D., Siler, S., Papageorgopoulos, C., Wieder, E., Schmidt, D., Hoh, R., Neese, R., Macallan, D., Deeks, S., and McCune, J. M. (1999). Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat. Med.* 5, 83-9.
529. Gorochoy, G., Neumann, A. U., Kereveur, A., Parizot, C., Li, T., Katlama, C., Karmochkine, M., Raguin, G., Autran, B., and Debré, P. (1998). Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoire during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat. Med.* 4, 215-21.
530. McCune, J. M. (1997). Thymic function in HIV-1 disease. *Semin. Immunol.* 9, 397-404.
531. Autran, B., Garcelain, G., Li, T. S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debre, P., and Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277, 112-6.
532. Li, T. S., Tubiana, R., Katlama, C., Calvez, Ait Mohand, H., and Autran, B. (1998). Long lasting recovery in CD4+ T cell function mirrors viral load reduction after highly active anti-retroviral therapy in patients with advanced HIV disease. *Lancet* 351, 1682-6.
533. Zhang, Z. Q., Notermans, D. W., Sedgewick, G., Cavert, W., Wietgreffe, S., Zupancic, M., Gebhard, K., Henry, K., Boies, L., Chen, Z., Jenkins, M., Mills, R., McDade, H., Goodwin, C., Schuwirth, C. M., Danner, S. A., and Haase, A. T. (1998). Kinetics of CD4+ T cell repopulation after treatment of HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1154-9.
534. Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A. T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362, 359-62.
535. Graziosi, C., Pantaleo, G., Butini, L., Demarest, J. F., Saag, M. S., Shaw, G. M., and Fauci, A. S. (1993). Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA and RNA synthesis during primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6405-9.
536. Levy, J. A. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* 57, 183-289.
537. Schenkel, A. R., Uno, H., and Pauza, C. D. (1999). Asymptomatic simian immunodeficiency virus infection decreases blood CD4(+) T cells by accumulating recirculating lymphocytes in the lymphoid tissues. *J. Virol.* 73, 601-7.
538. Chakrabarti, L. A., Sharon, N. L., Zhang, L., Gettie, A., Luckay, A., Martin, L. N., Skulsky, E., Ho, D. D., Cheng-Mayer, C., and Marx, P. A. (2000). Normal T-Cell turnover in sooty mangabeys harboring active simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 74, 1209-23.
539. Zinkernagel, R. M. (1995). Are HIV-specific CTL responses salutary or pathogenic? *Curr. Opin. Immunol.* 7, 462-70.
540. Lanzavecchia, A., Roosneck, E., Gregory, T., Berman, P., and Abrignani, S. (1988). T cells can present antigens such a HIV gp120 targeted to their own surface molecules. *Nature* 334, 530-2.
541. Weinhold, K. J., Lyerly, H. K., Stanley, S. D., Austin, A. A., Matthews, T. J., and Bolognesi, D. P. (1989). HIV-1 gp120-mediated immune suppression and lymphocyte destruction in the absence of viral infection. *J. Immunol.* 142, 3091-7.

542. Faith, A., O'Hehir, R. E., Malkovsky, M., and Lamb, J. R. (1992). Analysis of the basis of resistance and susceptibility of CD4+ T cells to human immunodeficiency virus (HIV)-gp120 induced anergy. *Immunology* 76, 177-84.
543. Ameisen, J. C., and Capron, A. (1991). Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* 12, 102-104.
544. Finkel, T. H., Tudor-Williams, G., Banda, N. K., Cotton, M. F., Curiel, T., Monks, C., Baba, T. W., Ruprecht, R. M., and Kupfer, A. (1995). Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat. Med.* 1, 129-34.
545. Gummuluru, S., Novembre, F. J., Lewis, M., Gelbard, H. A., and Dewhurst, S. (1996). Apoptosis correlates with immune activation in intestinal lymphoid tissue from macaques acutely infected by a highly enteropathic simian immunodeficiency virus, SIVsmmPBj14. *Virology* 225, 21-32.
546. Xu, C., Politch, J. A., Tucker, L., Mayer, K. H., Seage, G. R., 3rd, and Anderson, D. J. (1997). Factors associated with increased levels of human immunodeficiency virus type 1 DNA in semen. *J. Infect. Dis.* 176, 941-7.
547. Meyaard, L., Schuitemaker, H., and Miedema, F. (1993). T-cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function? *Immunol. Today* 14, 161.
548. Hodge, S., Novembre, F. J., and Dewhurst, S. (1998). Induction of fas ligand expression by an acutely lethal simian immunodeficiency virus, SIVsmmPBj14. *Virology* 252, 354-63.
549. Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Peffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., Gairin, J. E., Hahn, B. H., Oldstone, M. B., and Shaw, G. M. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* 3, 205-11.
550. Philips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R., Rizza, C. R., and McMichael, A. (1991). Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 354, 453-9.
551. Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267, 483-9.
552. Reitz, M. S., Wilson, C., Naugle, C., Gallo, R. C., and Robert-Guroff, M. (1988). Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene. *Cell* 54, 57-63.
553. Overbaugh, J., Rudensey, L. M., Papaenhausen, M. D., Benveniste, R. E., and Morton, W. R. (1991). Variation in simian immunodeficiency virus env is confined to V1 and V4 during progression to simian AIDS. *J. Virol.* 65, 7025-31.
554. Glamann, J., Burton, D. R., Parren, P. W., Ditzel, H. J., Kent, K. A., Arnold, C., Montefiori, D., and Hirsch, V. M. (1998). Simian immunodeficiency virus (SIV) envelope-specific Fabs with high-level homologous neutralizing activity: recovery from a long-term nonprogressor SIV-infected macaque. *J. Virol.* 72, 585-92.
555. Javaherian, K., Langlois, A. J., Montefiori, D. C., Kent, K. A., Ryan, K. A., Wyman, P. D., Stott, J., Bolognesi, D. P., Murphey-Corb, M., and Larosa, G. J. (1994). Studies of the conformation-dependent neutralizing epitopes of simian immunodeficiency virus envelope protein. *J. Virol.* 68, 2624-31.
556. Kinsey, N. E., Anderson, M. G., Unangst, T. J., Joag, S. V., Narayan, O., Zink, M. C., and Clements, J. E. (1996). Antigenic variation of SIV: mutations in V4 alter the neutralization profile. *Virology* 221, 14-21.
557. Mortara, L., Letourneur, F., Gras-Masse, H., Venet, A., Guillet, J. G., and Bourgault-Villada, I. (1998). Selection of virus variants and emergence of virus escape mutants after immunization with an epitope vaccine. *J. Virol.* 72, 1403-10.
558. Kanki, P. J., Hamel, D. J., J.L., S., C.C., H., Thior, I., Barin, F., Woodcock, S. A., Gueye-Ndiaye, A., Zhang, E., Montano, M., Siby, T., Marlink, R., NDoye, I., Essex, M. E., and MBoup, S. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J. Infect. Dis.* 179, 68-73.
559. Essex, M., Soto-Ramirez, L. E., Renjilo, B., Wang, W. K., and Lee, T. (1997). Genetic variation within human immunodeficiency virus generates rapid changes in tropism, virulence and transmission. *Leukemia* 11, 93-94.
560. Keet, I. P., Klein, M. R., Just, J. J., and Kaslow, R. A. (1996). The role of host genetics in the natural history of HIV-1 infection: the needles in the haystack. *AIDS* 10, S59-67.
561. Dittmar, M. T., Simmons, G., Hibbitts, S., O'Hare, M., Louisirrotchanakul, S., Beddows, S., Weber, J., Clapham, P. R., and Weiss, R. A. (1997). Langerhans cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 subtype A through F isolates derived from different transmission groups. *J. Virol.* 71, 8008-13.
562. Pope, M., Frankel, S. S., Mascola, J. R., Trkola, A., Isdell, F., Birx, D. L., Burke, D. S., Ho, D. D., and Moore, J. P. (1997). Human Immunodeficiency virus type 1 strains of subtypes B and E replicate in cutaneous dendritic cell-T-cell mixtures without displaying subtype-specific tropism. *J. Virol.* 71, 8001-7.
563. Yu, X. F., Matsuda, M., Essex, M., and Lee, T. H. (1990). Open reading frame vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein. *J. Virol.* 64, 5688-93.

564. Desrosiers, R. C., Lifson, J. D., Gibbs, J. S., Czajak, S. C., Howe, A. Y., Arthur, L. O., and Johnson, R. P. (1998). Identification of highly attenuated mutants of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 72, 1431-7.
565. Gibbs, J. S., Lackner, A. A., Lang, S. M., Simon, M. A., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., and Desrosiers, R. C. (1995). Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx. *J. Virol.* 69, 2378-83.
566. Hoch, J., Lang, S. M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Dittmer, U., Hunsmann, G., Fuchs, D., Muller, J., Sopper, S., and et al. (1995). vpr deletion mutant of simian immunodeficiency virus induces AIDS in rhesus monkeys. *J. Virol.* 69, 4807-13.
567. Ilyinskii, P. O., and Desrosiers, R. C. (1996). Efficient transcription and replication of simian immunodeficiency virus in the absence of NF-kappaB and Sp1 binding elements. *J. Virol.* 70, 3118-26.
568. Sinclair, E., Barbosa, P., and Feinberg, M. B. (1997). The *nef* gene products of both simian and human immunodeficiency viruses enhance virus infectivity and are functionally interchangeable. *J. Virol.* 71, 3641-51.
569. Cullen, B. R. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93, 685-92.
570. Alexander, L., Du, Z., Rosenzweig, M., Jung, J. U., and Desrosiers, R. C. (1997). A role for natural simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 *nef* alleles in lymphocyte activation. *J. Virol.* 71, 6094-9.
571. Iafrate, A. J., Bronson, S., and Skowronski, J. (1997). Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling. *EMBO J.* 16, 673-84.
572. Foster, J. L., Anderson, S. J., Frazier, A. L., and Garcia, J. V. (1994). Specific suppression of human CD4 surface expression by Nef from the pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239 open. *Virology* 201, 373-9.
573. Garcia, J. V., and Miller, A. D. (1991). Serine phosphorylation independent downregulation of cell-surface CD4 by *nef*. *Nature* 350, 508-11.
574. Hua, J., and Cullen, B. R. (1997). Human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus Nef use distinct but overlapping target sites for downregulation of cell surface CD4. *J. Virol.* 71, 6742-8.
575. Greenberg, M. E., Bronson, S., Lock, M., Neumann, G., Pavlakis, G. N., and Skowronski, J. (1997). Co-localisation of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 downregulation. *EMBO J.* 16, 6964-76.
576. Le Gall, S., Erdtmann, L., Benichou, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L., Benarous, R., Heard, J.-M., and Schwartz, O. (1998). Nef interacts with the  $\mu$  subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* 8, 483-95.
577. Piguet, V., Chen, Y. L., Mangasarian, A., Foti, M., Carpentier, J. L., and Trono, D. (1998). Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *EMBO J.* 17, 2472-81.
578. Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 *vpu* protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* 66, 7193-200.
579. Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and 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.
580. Greenberg, M. E., Ifrate, A. J., and Skowronski, J. (1998). The SH3 domain-binding surface and acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. *EMBO J.* 17, 2777-89.
581. Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., and Baltimore, D. (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391, 397-401.
582. Howcroft, T. K., Strebel, K., Martin, M. A., and Singer, D. S. (1993). Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science* 260, 1320-2.
583. De, S. K., and Marsh, J. W. (1994). HIV-1 Nef inhibits a common activation pathway in NIH-3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 6656-60.
584. Collette, Y., Mawas, C., and Olive, D. (1996). Evidence for intact CD28 signaling in T cell hyporesponsiveness induced by the HIV-1 *nef* gene. *Eur. J. Immunol.* 26, 1788-93.
585. Baur, A. S., Sawai, E. T., Dazin, P., Fantl, W. J., Cheng-Mayer, C., and Peterlin, B. M. (1994). HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity* 1, 373-84.
586. Graziani, A., Galimi, F., Medico, E., Cottone, E., Gramaglia, D., Boccaccio, C., and Comoglio, P. M. (1996). The HIV-1 *nef* protein interferes with phosphatidylinositol 3-kinase activation 1. *J. Biol. Chem.* 271, 6590-3.
587. Greenway, A., Azad, A., and McPhee, D. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits activation pathways in peripheral blood mononuclear cells and T-cell lines. *J. Virol.* 69, 1842-50.
588. Niederman, T. M., Garcia, J. V., Hastings, W. R., Luria, S., and Ratner, L. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits NF-kappa B induction in human T cells. *J. Virol.* 66, 6213-9.
589. Luria, S., Chambers, I., and Berg, P. (1991). Expression of the type 1 human immunodeficiency virus *nef* protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukine 2 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5326-30.

590. Du, Z., Lang, S. M., Sasseville, V. G., Lackner, A. A., Ilyinskii, P. O., Daniel, M. D., Jung, J. U., and Desrosiers, R. C. (1995). Identification of a nef allele that causes lymphocyte activation and acute disease in macaque monkeys. *Cell* 82, 665-74.
591. Hanna, Z., Kay, D. G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., and Jolicoeur, P. (1998). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95, 163-75.
592. Lindemann, D., Wilhelm, R., Renard, P., Althage, A., Zinkernagel, R., and Mous, J. (1994). Severe immunodeficiency associated with a human immunodeficiency virus 1 NEF/3'-long terminal repeat transgene. *J. Exp. Med.* 179, 797-807.
593. Luo, W., and Peterlin, B. M. (1997). Activation of the T-cell receptor signaling pathway by Nef from an aggressive strain of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 71, 9531-7.
594. Skowronski, J., Parks, D., and Mariani, R. (1993). Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO J.* 12, 703-13.
595. Gougeon, M. L., and Montagnier, L. (1993). Apoptosis in AIDS. *Science* 260, 1269-70.
596. Groux, H., Torpeir, G., Monte, D., Mouton, Y., Capron, A., and Ameisen, J. C. (1992). Activation induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virusinfected asymptomatic individuals. *J. Exp. Med.* 175, 331-40.
597. Terai, C., Kornbluth, R. S., Pauza, C. D., Richman, D. D., and Carson, D. A. (1991). Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J. Clin. Invest.* 87, 1710-5.
598. Chimurle, N., Goonewardena, H., Pahwa, S., Pasiaka, R., and Kalyanaraman, V. S. (1995). HIV-1 envelope glycoproteins induce activation of activated protein-1 in CD4+ T cells. *J. Biol. Chem.* 270, 19364-9.
599. Pantaleo, G., Demarest, J. F., Schacker, T., Vaccarezza, M., Cohen, O. J., Daucher, M., Graziosi, C., Schnittman, S. S., Quinn, T. C., Shaw, G. M., Perrin, L., Tambussi, G., Lazzarin, A., Sekaly, R. P., Soudeyans, H., Corey, L., and Fauci, A. S. (1997). The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 254-258.
600. Koup, R., Safrit, J., Cao, Y., Andrews, C., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, 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, 4650-5.
601. Homsy, J., Meyer, M., Tateno, M., Clarkson, S., and Levy, J. A. (1989). The Fc and not CD4 receptor mediates antibody dependent enhancement of HIV infection of human cells. *Science* 244, 1357-60.
602. Robinson, J. W. R., Montefiori, D. C., and Mitchell, W. M. (1990). Complement-mediated antibody-dependent enhancement of HIV-1 infection requires CD4 and complement receptors. *Virology* 175, 600-04.
603. Montefiori, D. C., Lefkowitz Jr, L. B., Keller, R. E., Holmberg, V., Sandstrom, E., and Phair, J. P. (1991). Absence of a clinical correlation for complement-mediated infection-enhancing antibodies in plasma or sera from HIV-1-infected individuals. *AIDS* 5, 513-7.
604. Eichberg, J. W., Montiel, M. M., Morale, B. A., King, D. E., Chanh, T. C., Kennedy, R. C., and Dreesman, G. R. (1988). Lymphocyte subsets in chimpanzees. *Lab. Anim. Sci.* 38, 197-8.
605. Bofill, M., Janossy, G., Lee, C. A., MacDonald-Burns, D., Phillips, A. N., Sabin, C., Timms, A., Johnson, M. A., and Kernoff, P. B. (1992). Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.* 88, 243-52.
606. Stites, D., Moss, A., Bacchetti, P., Osmond, D., McHugh, T., Wang, Y., Hebert, S., and Colfer, B. (1989). Lymphocyte subset analysis predict progression to AIDS in a cohort of homosexual men in San Francisco. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52, 96-103.
607. Terao, K., Rose, L. M., Sackett, G. P., and Clark, E. A. (1988). Development of lymphocyte subsets in pigtailed macaques. *Hum. Immunol.* 21, 33-48.
608. Cheynier, R., Langlade, D. P., Maescot, M. R., Blanche, S., Blondin, G., Wain, H. S., Griscelli, C., Vilmer, E., and Plata, F. (1992). Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur. J. Immunol.* 22, 2211-7.
609. Rowland-Jones, S., Nixon, D., Aldhous, M., Gotch, F., Ariyoshi, K., Hallam, N., Kroll, J., Froebel, K., and Mc Michael, A. (1993). HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* 341, 860-1.
610. Langlade-Demoyen, P., Ngo-Giang-Huong, N., Ferchal, F., and Oksenhendler, E. (1994). Human immunodeficiency virus (HIV) nef-specific cytotoxic T lymphocytes in noninfected heterosexual contact of HIV-infected patients. *J. Clin. Invest.* 93, 1293-7.
611. Rowland-Jones, S., Sutton, J., Ariyoshi, K., and al. (1995a). HIV-1 specific cytotoxic T cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nature Medicine* 1, 59-64.
612. Abimiku, A. G., Franchini, G., Aldrich, K., Myagkikh, M., Markham, P., Gard, E., Gallo, R. C., and Robert-Guroff, M. (1995). Humoral and cellular immune responses in rhesus macaques infected with human immunodeficiency virus type 2. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11, 383-93.

613. Heeney, J. L., Holterman, L., ten Haft, P., Dubbes, R., Koornstra, W., Teeuwse, V., Bourquin, P., Norley, S., and Nijhuis, H. (1994). Vaccine protection and reduced virus load from heterologous macaque-propagated SIV challenge. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10(Suppl 2), S117-21.
614. Gallimore, A., Cranage, M., Cook, N., Almond, N., Bootman, J., Rud, E., Silvera, P., Dennis, M., Corcoran, T., Stott, J., McMichael, A., and Gotch, F. (1995). Early suppression of SIV replication by CD8+ nef-specific cytotoxic T cells in vaccinated macaques. *Nat. Med.* 1, 1167-73.
615. Von Herrath, M., Oldstone, M. B., and Fox, H. S. (1995). Simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CTL in cerebrospinal fluid and brains of SIV-infected rhesus macaques. *J. Immunol.* 154, 5582-9.
616. Lohman, B. L., McChesney, M. B., Miller, C. J., McGowan, E., Joye, S. M., Van Rompay, K. K., Reay, E., Antipa, L., Pedersen, N. C., and Marthas, M. L. (1994). A partially attenuated simian immunodeficiency virus induces host immunity that correlates with resistance to pathogenic virus challenge. *J. Virol.* 68, 7021-9.
617. Miller, M. D., Lord, C. I., Stallard, V., Mazzara, G. P., and Letvin, N. L. (1989). Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys infected with simian immunodeficiency virus of macaques. *J. Immunol.* 144, 122-8.
618. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B., Shaw, G., and Oldstone, M. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 68, 6103-10.
619. Gotch, F., Gallimore, A., and McMichael, A. (1996). Cytotoxic T cells - protection from disease - protection from infection. *Immunol. lett.* 51, 125-128.
620. Jassoy, C., and Walker, B. (1997). HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and the control of HIV-1 replication. *Springer Semin. Immunopathol.* 18, 341-54.
621. Ogg, G. S., Xia, J., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, A., Ho, D. D., Nixon, D. F., and McMichael, A. J. (1998). Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279, 2103-6.
622. Bourgault, I., Villefroy, P., Beyer, C., Aubertin, A. M., Levy, J. P., and Venet, A. (1993). Cytotoxic T-cell response and AIDS-free survival in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *AIDS* 7 Suppl 2, S73-9.
623. Ten Haft, P., Cornelissen, M., Goudsmit, J., Koornstra, W., Dubbes, R., Nijhuis, H., Peeters, M., Thiriart, C., Bruck, C., and Heeney, J. L. (1995). Virus load in chimpanzees infected with human immunodeficiency virus type 1: effect of pre-exposure vaccination. *J Gen Virol* 76, 1015-20.
624. Klein, M., van Baalen, C., Holwerda, A., Garde, S., Bende, R., Keet, I., Eeftinck-Schattenkerk, J., Osterhaus, A., Schuitmaker, H., and Miedema, F. (1995). Kinetics of gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J. Exp. Med.* 181, 1365-72.
625. Rinaldo, C., Huang, X. L., Fan, Z., Ding, M., Beltz, L., Logar, A., Panicali, D., Mazzara, G., Liebmann, J., Cottrill, M., and Gupta, P. (1995). High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J. Virol.* 69, 5838-42.
626. Gotch, F. M., Nixon, D. F., Alp, N., McMichael, A. J., and Borysiewicz, L. K. (1990). High frequency of memory and effector gag specific cytotoxic T lymphocytes in HIV seropositive individuals. *Int. Immunol.* 2, 707-12.
627. Hoffenbach, A., Langlade-Demoyen, P., Dadaglio, G., Vilmer, E., Michel, F., Mayaud, C., Autran, B., and Plata, F. (1989). Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* 145, 3699-705.
628. Riviere, Y., Tanneau-Salvadori, F., Regnault, A., Lopez, O., Sansonetti, P., Guy, B., Kieny, M. P., Fournel, J. J., and Montagnier, L. (1989). Multiple cytotoxic effector cells are induced by infection with the human immunodeficiency virus. *Res. Immunol.* 140, 110-5; discussion 121.
629. Walker, B. D., Chakrabarti, S., Moss, B., Paradis, T. J., Flynn, T., Durno, A. G., Blumberg, R. S., Kaplan, J. C., Hirsch, M. S., and Schooley, R. T. (1987). HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 328, 345-8.
630. Erickson, J., and Kempf, D. (1994). Structure-based design of symmetric inhibitors of HIV-1 protease. *Arch. Virol. Suppl.* 9, 19-29.
631. Shen, L., Chen, Z. W., and Letvin, N. L. (1994). The repertoire of cytotoxic T lymphocytes in the recognition of mutant simian immunodeficiency virus variants. *J. Immunol.* 153, 5849-54.
632. Vuillier, F., Bianco, N. E., Montagnier, L., and Diegheiro, G. (1989). Selective depletion of low density CD8+/CD16+ lymphocytes during HIV-infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 4, 121.
633. Vowels, B. R., Gershwin, M. E., Gardner, M. B., and McGraw, T. P. (1990). Natural killer cell activity of rhesus macaques against retrovirus-pulsed CD4+ target cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6, 905-18.



634. Ferrari, G., Cranage, M., Place, C., Nigida, S. M. J., Arthur, L. O., and Weinholt, K. J. (1993). The impact of HIV-1 infection on phenotypic and functional parameters of cellular immunity in chimpanzees. *AIDS Res. Hum. Retrovirus* 9, 647-56.
635. Josephs, S. F., Wong-Staal, F., Manzari, V., Gallo, R. C., Sodroski, J. G., Trus, M. D., Perkins, D., Putarca, R., and Haseltine, W. A. (1984). Long terminal repeat of an American isolate of type I human T cell leukemia virus. *Virology* 139, 340-5.
636. Kurth, R., and Norley, S. (1994). Simian immunodeficiency viruses of African green monkeys. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 188, 21-33.
637. Riviere, Y., McChesnay, M. B., Porrot, F., Tanneau-Salvadori, F., Sansonetti, P., Lopez, O., Pialoux, G., Feuillie, V., Mollereau, M., Chamaret, S., Tekaiia, F., and Montagnier, L. (1995). Gag-specific cytotoxic responses to HIV Type 1 are associated with a decreased risk of progression to AIDS-Related Complex to AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11, 903-7.
638. Goulder, P. J., Phillips, R. E., Colbert, R. A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M. A., Giangrande, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., McMichael, A. J., and Rowland-Jones, S. (1997). Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* 1997, 212-7.
639. Haas, G., Plikat, U., Debre, P., Lucchiari, M., Katlama, C., Dudoit, Y., Bonduelle, O., Bauer, M., Ihlenfeldt, H. G., Jung, G., Maier, B., Meyerhans, A., and Autran, B. (1996). Dynamics of viral variants in HIV-1 Nef and specific and specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Immunol.* 157, 4212-21.
640. Wolinsky, S. M., Korber, B. T. M., Neumann, A. U., Daniels, M., Kunstman, K. J., Whetsell, A. J., Furtado, M. R., Cao, Y., Ho, D. D., Safrit, J. T., and Koup, R. A. (1996). Adaptive evolution of human immunodeficiency virus type 1 during the natural course of infection. *Science* 272, 537-42.
641. Kalams, S. A., Johnson, R. P., Dynan, M. J., Hartman, K. E., Harrer, T., Harrer, E., Trocha, A. K., Blattner, W. A., Buchbinder, S. P., and Walker, B. D. (1996). T cell receptor usage and fine specificity of human immunodeficiency virus 1-specific cytotoxic T lymphocytes clones: analysis of quasispecies recognition reveals a dominant response against a minor in vivo variant. *J. Exp. Med.* 183, 1669-79.
642. Nowak, M. A., May, R. M., Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Laloo, D. G., McAdam, S., Klenerman, P., Koppe, B., Sigmund, K., Bangham, C. R., and et al. (1995). Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections. *Nature* 375, 606-11.
643. Kannagi, M., Masuda, T., Hattori, T., Kanoh, T., Nasu, K., Yamamoto, N., and Harada, S. (1990). Interference with human immunodeficiency virus (HIV) replication by CD8+ T cells in peripheral blood leukocytes of asymptomatic HIV carriers *in vitro*. *J Virol* 64, 3399-406.
644. Tsubota, H., Ringler, D. J., Kannagi, M., King, N. W., Solomon, K. R., MacKey, J. J., Walsh, D. G., and Letvin, N. L. (1989). CD8+CD4- lymphocyte lines can harbor the AIDS virus *in vitro*. *J. Immunol.* 143, 858-63.
645. Walker, C. M., Erickson, A. L., Hsueh, F. C., and Levy, J. A. (1991). Inhibition of human immunodeficiency virus replication in acutely infected CD4+ cells by CD8+ cells involves a noncytotoxic mechanism. *J Virol* 65, 5921-7.
646. Bleul, C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-32.
647. Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J., Clark-Lewis, I., Legler, D., Loetscher, M., Baggiolini, M., and Moser, B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LSTR/fusin and prevents infection by T-cell- line adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-5.
648. Murphy, P. M. (1996). Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 47-64.
649. Kestens, L., Vanham, G., Gigase, P., Young, G., Hannel, I., Vanlangendonck, F., Hulstaert, F., and Bach, B. A. (1992). Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *AIDS* 6, 793-7.
650. Kestens, L., Vingerhoets, J., Peeters, M., Vanham, G., Vereecken, C., Penne, G., Niphuis, H., Eeerd, v. P., Groen, v. d. G., Gigase, P., and et al. (1995). Phenotypic and functional parameters of cellular immunity in a chimpanzee with a naturally acquired SIV infection. *J Infect Dis* 172, 957-63.
651. Blackbourn, D. J., Chuang, L. F., Killam, K. F., Jr., and Chuang, R. Y. (1994). Inhibition of simian immunodeficiency virus (SIV) replication by CD8+ cells of SIV-infected rhesus macaques: implications for immunopathogenesis. *J Med Primatol* 23, 343-54.
652. Joag, S. V., Stephens, E. B., Adams, R. J., Foresman, L., and Narayan, O. (1994). Pathogenesis of SIVmac infection in chinese and indian rhesus macaques : effects of splenectomy on virus burden. *Virology* 200, 436-46.
653. Knuchel, M., Bednarik, D. P., Chikkala, N., and Ansari, A. A. (1994). Biphasic *in vitro* regulation of retroviral replication by CD8+ cells from nonhuman primates. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7(5), 438-46.

654. Powell, J. D., Bednarik, D. P., Folks, T. M., Jehuda-Cohen, T., Villinger, F., Sell, K. W., and Ansari, A. A. (1993). Inhibition of cellular activation of retroviral replication by CD8+ T cells derived from non-human primates. *Clin Exp Immunol* 91, 473-81.
655. Baier, M., Werner, A., Bannert, N., Metzger, K., and Kurth, R. (1995). HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 378, 563.
656. Fauci, S. A. (1996). Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384, 529-34.
657. Poli, G., Vicenzi, E., Ghezzi, S., and Lazzarin, A. (1995). Cytokines in the acquired immunodeficiency syndrome and other infectious diseases. *Int J Clin Lab Res* 25, 128-34.
658. Graziosi, C., Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1994). Comparative analysis of constitutive cytokine expression in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals. *Res Immunol* 145, 602-5.
659. Khatissian, E., Tovey, M. G., Cumont, M. C., Monceaux, V., Lebon, P., Montagnier, L., Hurtrel, B., and Chakrabarti, L. (1996). The relationship between the interferon alpha response and viral burden in primary SIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12, 1273-8.
660. Mosmann, T. R. (1994). Cytokine patterns during the progression to AIDS. *Science* 265, 193-4.
661. Clerici, M., Clark, E. A., Polacino, P., Axberg, I., Kuller, L., Casey, N. I., Morton, W. R., Shearer, G. M., and Benveniste, R. E. (1994). T-cell proliferation to subinfectious SIV correlates with lack of infection after challenge of macaques. *AIDS* 8, 1391-5.
662. Clerici, M., and Shearer, G. M. (1993). A Th1 and Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 14, 107.
663. Graziosi, C., Pantaleo, G., Gantt, K. R., Fortin, J. P., Demarest, J. F., Cohen, O. J., Sekaly, R. P., and Fauci, A. S. (1994). Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science* 265, 248-52.
664. Maggi, E., Mazetti, M., Ravina, A., Annunziato, F., De Carli, M., Piccinni, M. P., Manetti, R., Carbonari, M., Pesce, A. M., Del Prete, G., and Romagnani, S. (1994). Ability of HIV-1 to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science* 265, 244-48.
665. Brenner, B. G., Dascal, A., Margolese, R. G., and Wainberg, M. A. (1989). Natural killer cell function in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related diseases. *J Leukoc Biol* 46, 75-83.
666. Plaeger-Marshall, S., Spina, C. A., Giordi, J. V., Mitsuyasu, R., Wolfe, P., Gottlieb, M., and Beall, G. (1987). Alterations in cytotoxic and phenotypic subsets of natural killer cells in AIDS. *J. Clin. Immunol.* 7, 16.
667. Cai, Q., Huang, X. L., Rappocciolo, G., and Rinaldo, C. R., Jr. (1990). Natural killer cell responses in homosexual men with early HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 3, 669-76.
668. Bonavida, B., Katz, J., and Gottlieb, M. (1986). Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. I. Defective trigger on NK cells for NKCF production by target cells, and partial restoration by IL 2. *J Immunol* 137, 1157-63.
669. Broliden, K., Hinkula, J., Tolvenstam, T., Niphuis, H., and Heeney, J. L. (1996). Antibody dependant cellular cytotoxicity to clinical isolates of HIV-1 and SIVcpz: Comparison of humans and chimpanzees. *AIDS* 10, 1199-204.
670. Ferrari, G., Place, C. A., Ahearne, P. A., Negida, S. M. J., Arthur, L. O., Bolognesi, D. P., and Weinhold, K. J. (1994). Comparison of anti-HIV 1 ADCC reactivities in infected humans and chimpanzees. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 7, 325-331.
671. Tyler, D. S., Lysterly, H. K., and Weinhold, K. J. (1989). Anti-HIV-1 ADCC. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5, 557.
672. Belo, M., Yagello, M., Girard, M., Greenlee, R., Deslandres, A., Barre-Sinoussi, F., and Gluckmann, J. (1991). Antibody-dependent cellular cytotoxicity against HIV-1 in sera immunized chimpanzees. *AIDS* 5, 169-76.
673. Siegel, F., Kurth, R., and Norley, S. (1995). Neither whole inactivated virus immunogen nor passive immunoglobulin transfer protects against SIVagm infection in the African green monkey natural host. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 8, 217-26.
674. Ohkawa, S., Wilson, L. A., Larosa, G., Javaherian, K., Martin, L. N., and Murphey-Corb, M. (1994). Immune response induced by prototype vaccines for AIDS in rhesus monkeys. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 27-38.
675. Lysterly, H. K., Matthews, T. J., Langlois, A. J., Bolognesi, D. P., and Weinhold, K. J. (1987). Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp 120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves a target for immune attack. *Proc Natl Acad Sci* 84, 4601-5.
676. Golding, H., Robey, F. A., Gatesii, F. T., Linder, W., Beining, P. R., Hoffman, T., and Golding, B. (1988). Identification of homologous regions in human deficiency virus I gp41 and human MHC class II beta domain. *J. Exp. Med.* 167, 914-23.
677. Yamamoto, H., Hirayama, M., Genya, C., and Kaplan, J. (1994). TGF beta mediates natural suppressor activity of IL-2 activated lymphocytes. *J. Immunol.*, 3842-47.

678. Autran, B., and Letvin, N. L. (1991). HIV epitopes recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *AIDS* 5, S145-S150.
679. Sadat-Sowti, B., Debre, P., Idziorek, T., Guillon, J. M., Hadida, F., Okzenhendler, E., Katlama, C., Mayaud, C., and Autran, B. (1991). A lectin-binding soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from AIDS patients inhibits T cell cytotoxicity. *Eur J Immunol* 21, 737-41.
680. Jolly, P. E., Huso, D., Hart, G., and Narayan, O. (1989). Modulation of lentivirus replication by antibodies. Non-neutralizing antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus enhance early stages of infection in macrophages, but not cause increased production of virions. *J. Gen. Virol.* 70, 2221-6.
681. Zachar, V., Mikulacky, M., Mayer, V., Mackay, I., and Frazer, I. (1988). A biomedical view on normal values of CD4 and CD8 lymphocyte counts in peripheral blood. *Pathology* 20, 358-60.
682. Oksenhendler, E., Autran, B., Gorochov, G., D'Agay, M. F., Seligmann, M., and Clauvel, J. (1992). CD8 lymphocytosis and pseudotumoral splenomegaly in HIV infection. *Lancet* 340, 207-8.
683. Mackewicz, C., Yang, L., Lifson, J., and Levy, J. (1996). Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection. *Lancet* 344, 1671-73.
684. Ohashi, T., Arai, M., Kato, H., Kubo, M., Fujii, M., Yamamoto, N., Iwamoto, A., and Kannagi, M. (1998). High SDF-1 expression in HIV-1 carriers does not correlate with CD8+ T- cell-mediated suppression of viral replication. *Virology* 244, 467-72.
685. Chen, C. H., Weinhold, K. J., Bartlett, J. A., Bolognesi, D. P., and Greenberg, M. L. (1993). CD8+ T lymphocyte-mediated inhibition of HIV-1 long terminal repeat transcription: a novel antiviral mechanism. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9, 1079-86.
686. Mackewicz, C. E., Blackbourn, D. J., and Levy, J. A. (1995). CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2308-12.
687. Scala, E., and al. (1997). C-C chemokines, IL-16 and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. *J. Immunol.* 158, 4485-92.
688. Blackbourn, D. J., Mackewicz, C. E., Barker, E., Hunt, T. K., Herndier, B., Haase, A. T., and Levy, J. A. (1996). Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+ cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13125-30.
689. Yang, O. O., and al. (1997). Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J. Virol.* 71, 3120-3128.
690. Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., and Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86, 367-77.
691. Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyltermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene [see comments]. *Nature* 382, 722-5.
692. Rana, S., Besson, G., Cook, D. G., Rucker, J., Smyth, R. J., Yi, Y., Turner, J. D., Guo, H. H., Du, J. G., Peiper, S. C., Lavi, E., Samson, M., Libert, F., Liesnard, C., Vassart, G., Doms, R. W., Parmentier, M., and Collman, R. G. (1997). Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. *J Virol* 71, 3219-27.
693. Zimmerman, P. A., Buckler-White, A., Alkhatib, G., Spalding, T., Kubofcik, J., Combadière, C., Weissman, D., Cohen, O., Rubbert, A., Lam, G., Vaccarezza, M., Kennedy, P. E., Kumaraswami, V., Giorgi, J. V., Detels, R., Hunter, J., Chopek, M., Berger, E. A., Fauci, A. S., Nutman, T. B., and Murphy, P. M. (1997). Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5 : studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol. Med.* 3, 23-36.
694. Biti, R., French, R., Young, J., Bennetts, B., and Stewart, G. (1997). HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 allele. *Nat. Med.* 3, 252-53.
695. Theodorou, I., Meyer, L., Magierowska, M., Katlama, C., and Rouzioux, C. (1997). HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5-delta32. *Lancet* 349, 1219-20.
696. Benkirane, M., Jin, D. Y., Chun, R. F., Koup, R. A., and Jeang, K. T. (1997). Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem* 272, 30603-6.
697. Wu, L., Paxton, W. A., Kassam, N., Ruffing, N., Rottman, J. B., Sullivan, N., Choe, H., Sodroski, J., Newman, W., Koup, R. A., and Mackay, C. R. (1997). CCR5 Levels and Expression Pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J. Exp. Med.* 185, 1681-91.
698. Eugen-Olsen, J., Iversen, A. K. N., Garred, P., Koppelhus, U., Pedersen, C., Benfield, T. L., Sorensen, A. M., Katzenstein, T., Dickmeiss, E., Gerstoft, J., Skinhoj, P., Svejgaard, A., Nielsen, J. O., and Hofmann, B.

- (1997). Heterozygosity for a deletion in the *CCR5* gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* 11, 305-10.
699. Michael, N. L., Louie, L. G., Rohrbaugh, A. L., Schultz, K. A., Dayhoff, D. E., Wang, C. E., and Sheppard, H. W. (1997). The role of *CCR5* and *CCR2* polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 3, 338-40.
700. Carrington, M., Kissner, T., Gerrard, B., Ivanov, S., O'Brien, S. J., and Dean, M. (1997). Novel alleles of the chemokine-receptor gene *ccr5*. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 1261-67.
701. Quillent, C., Oberlin, E., Braun, J., Rousset, D., Gonzalez-Canali, G., Metais, P., Montagnier, L., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Beretta, A. (1998). HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of *CCR5* gene. *Lancet* 351, 14-8.
702. Anzala, A. O., Ball, T. B., Rostron, T., O'Brien, S. J., Plummer, F. A., and Rowland-Jones, S. L. (1998). *CCR2-64I* allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. *Lancet* 351, 1632-3.
703. Rizzardì, G. P., Morawetz, R. A., Vicenzi, E., Ghezzi, S., Poli, G., Lazzarin, A., and Pantaleo, G. (1998). *CCR2* polymorphism and HIV disease. Swiss HIV Cohort. *Nat Med* 4, 252-3.
704. Hoffman, T. L., Stephens, E. B., Narayan, O., and Doms, R. W. (1998). HIV type I envelope determinants for use of the *CCR2b*, *CCR3*, *STRL33*, and *APJ* coreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11360-5.
705. Gozlan, M. (1995). Update on HIV transmission and pathogenesis. *Lancet* 346, 1290.
706. Cameron, P. U., Mallal, S. A., French, M. A., and Dawkins, R. L. (1990). Major histocompatibility complex genes influence the outcome of HIV infection. Ancestral haplotypes with *C4* null alleles explain diverse HLA associations. *Hum Immunol* 29, 282-95.
707. Kaslow, R. A. (1990). *A1*, *Cw7*, *B8*, *DR3* HLA antigen combination associated with rapid decline of T-helper lymphocytes in HIV-1 infection: A report from Multicenter AIDS cohort Study. *Lancet* 335, 927-30.
708. Kaslow, R. A., and Mann, D. L. (1994). The role of the major histocompatibility complex in human immunodeficiency virus infection--ever more complex? *J Infect Dis* 169, 1332-3.
709. Kaslow, R. A., Carrington, M., Apple, R., Park, L., Munoz, A., Saah, J., Goedert, J. J., Winkler, C., O'Brien, S. J., Rinaldo, C., Detels, R., Blattner, W., Phair, J., Erlich, H., and Mann, D. L. (1996). Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature Medicine* 2(4), 405-411.
710. Keet, I. P. M., Krijnen, P., Koot, M., Lange, J. M. A., Miedema, F., Goudsmit, J., and Coutinho, R. A. (1993). Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters. *AIDS* 7, 51-7.
711. Klein, M. R., Keet, I. P., D'Amaro, J., Bende, R. J., Hekman, A., Mesman, B., Koot, M., de Waal, L. P., Coutinho, R. A., and Miedema, F. (1994). Associations between HLA frequencies and pathogenic features of human immunodeficiency virus type 1 infection in seroconverters from the Amsterdam cohort of homosexual men. *Journal of Infectious Diseases* 169, 1244-49.
712. Mann, D. L., Carrington, M., O'Donnell, M., Miller, T., and Goedert, J. (1992). HLA phenotype is a factor in determining rate of disease progression and outcome in HIV-1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 1345-6.
713. Arthur, L. O., Bess, J. W. J., Sowder II, R. C., Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J.-C., and Henderson, L. E. (1992). Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 258, 1935-39.
714. Rowland-Jones, S. L., and McMichael, A. (1995). Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus? *Curr. Opin. Immunol.* 7, 448-55.
715. Louie, L. G., Newman, B., and King, M. C. (1991). Influence of host genotype on progression to AIDS among HIV-infected men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 4, 814-8.
716. Brutkiewicz, R. R., and Welsh, R. M. (1995). Major histocompatibility complex class I antigens and the control of viral infections by natural killer cells. *J Virol* 69, 3967-71.
717. Jeannot, M., Sztajzel, R., Carpentier, N., Hirschel, B., and Tiercy, J. M. (1989). HLA antigens are risk factors for development of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2, 28-32.
718. Itescu, S., Rose, S., Dwyer, E., and Winchester, R. (1994). Certain HLA-DR5 and -DR6 major histocompatibility complex class II alleles are associated with a CD8 lymphocytic host response to human immunodeficiency virus type 1 characterized by low lymphocyte viral strain heterogeneity and slow disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11472-76.
719. Ascher, M. S., Sheppard, H. W., Krowska, J. F., and Biernemann, H. J. (1995). AIDS as immune system activation. Key questions that remain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 374, 203-10.
720. Bukrinsky, M. I., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., and Stevenson, M. (1991). Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 254, 423-7.
721. Folks, T., Kelly, J., Benn, S., Kinter, A., Justement, J., Gold, J., Redfield, R., Sell, K. W., and Fauci, A. S. (1986). Susceptibility of normal human lymphocytes to infection with HTLV-III/LAV. *J. Immunol* 136, 4049-53.

722. Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A., and Chen, I. S. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61, 213-22.
723. Claydon, E. J., Bennett, J., Gor, D., and Forster, S. M. (1991). Transient elevation of serum HIV antigen levels associated with intercurrent infection. *AIDS* 5, 113-4.
724. Heng, M. C., Heng, S. Y., and Allen, S. G. (1994). Co-infection and synergy of human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus-1. *Lancet* 343, 255-58.
725. Israel-Biet, D., Cadranet, J., and Even, P. (1993). Human immunodeficiency virus production by alveolar lymphocytes is increased during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am. Rev. Respir.* 148, 1308-12.
726. Brown, C. C., Poli, G., Lubaki, N., St Louis, M., Davachi, F., Musey, L., Manzila, T., Kovacs, A., Quinn, T. C., and Fauci, A. S. (1994). Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha in Zairian neonate plasmas: implications for perinatal infection with the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 169, 975-80.
727. Thea, D. M., Porat, R., Nagimbi, K., Baangi, M., St Louis, M. E., Kaplan, G., Dinarello, C. A., and Keusch, G. T. (1996). Plasma cytokines, cytokine antagonists, and disease progression in African women infected with HIV-1. *Ann Intern Med* 124, 757-62.
728. Whalen, C., Horsburgh, C. R., Hom, D., Lahart, C., Simberkoff, M., and Ellner, J. (1995). Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 129-35.
729. Fowke, K. R., Nagelkerke, N. J. D., Kimani, J., and al. (1996). Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* 348, 1347-51.
730. Archibald, D. W., Witt, D. J., Craven, D. E., Vogt, M. W., Hirsch, M. S., and Essex, M. (1987). Antibodies to human immunodeficiency virus in cervical secretions from women at risk for AIDS. *J. Infect. Dis.* 156, 240-41.
731. CDC. (1982). Update on the acquired immune deficiency syndrome (AIDS)-United States. *MMWR* 34, 507-8, 513-14.
732. Mazzoli, S., Tribattoni, D., Lo Caputo, S., Piconi, S., Ble, C., Meacci, F., Ruzzante, S., Salvi, A., Semplici, F., Longhi, R., Fusi, M. L., Tofani, L., Biasin, M., Villa, M. L., Mazzotta, F., and Clerici, M. (1997). HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat. Med.* 3, 1250-57.
733. Oravecz, T., Pall, M., and Norcorss, M. A. (1996).  $\beta$ -chemokine inhibition of monocyctotropic HIV-1 infection: interference with a post-binding fusion step. *J. Immunol.* 157, 1329-33.
734. Paxton, W. A., Martin, S. R., Tse, D., O'Brien, T. R., Skurnick, J., VanDevanter, N. L., Padian, N., Braun, J. F., Kotler, D. P., Wolinsky, S. M., and Koup, R. A. (1996). Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med* 2, 412-7.
735. Gautier-Hion, A., Colyn, M., and Gautier, J. P. (1999). "Histoire naturelle des primates d'Afrique centrale." Ecofac ed., Gabon.
736. Hoshino, J., Mori, A., Kudo, H., and Kawai, M. (1984). Preliminary report on the grouping of mandrills (*Mandrillus sphinx*) in Cameroon. *Primates* 25, 295-305.
737. Jouventin, P. (1975). Observations sur la socio-écologie du mandrill. *Terre Vie* 29, 493-532.
738. Kudo, H. (1987). The study of vocal communication of wild mandrills in Cameroon in relation to their social structure. *Primates* 28, 289-308.
739. Hawkey, C. M. (1975). Comparative Mammalian Haematology. Cellular Components and Blood Coagulation of Captive Wild Animals. London: William Heinemann Medical Books Ltd.
740. Huser, H. J. (1970). Atlas of Comparative Primate Haematology. New York and London: Academic Press.
741. Peinado, V. I., Celdran, J. F., Viscor, G., and Palomeque, J. (1996). Hematology and serum chemistry in the white-crowned (*Cercocebus torquatus lunatus*) and in the mandrill (*Mandrillus sphinx*). *J. Med. Primatol.* 25, 282-286.
742. Daufi, L. (1970). "Constantes biologicas de interés clinico (4th ed.)." Ediciones Técnicas Danae ed., Barcelona.
743. Sakai, H., Sakuragi, J., Sakuragi, S., Shibata, R., Hayami, M., Ishimoto, A., and Adachi, A. (1992). Genetic characterization of simian immunodeficiency virus isolated from an African mandrill. *Arch Virol* 125(1-4), 1-14.
744. Cooper, D., Tindall, B., Wilson, E., Imrie, A., and Penny, R. (1988). Characterization of T lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 157, 889-96.
745. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*(4839), 487-91.
746. Reimann, K. A., Tenner-Racz, K., Racz, P., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Lin, W., Ransil, B. J., and Letvin, N. L. (1994). Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Virol* 68, 2362-70.
747. Wykrzykowska, J. J., Rosenzweig, M., Veazey, R. S., Simon, M. A., Halvorsen, K., Desrosiers, R. C., Johnson, R. P., and Lackner, A. A. (1998). Early regeneration of thymic progenitors in rhesus macaques infected with simian immunodeficiency virus. *J Exp Med* 187, 1767-78.

748. Phillips, A. N. (1996). Reduction of HIV concentration during acute infection: independence from a specific immune response. *Science* 271, 497-9.
749. Safrit, J. T., and Koup, R. A. (1995). The immunology of primary HIV infection: which immune responses control HIV replication? *Curr Opin Immunol* 7, 456-61.
750. Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-6.
751. Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Saag, M. S., and Shaw, G. M. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373, 117-122.
752. Gougeon, M. L., Lecoq, H., Dulioust, A., Enouf, M. G., Crouvoiser, M., Goujard, C., Debord, T., and Montagnier, L. (1996). Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 156, 3509-20.
753. Haase, A. T. (1999). Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 17, 625-56.
754. Beer, B., Denner, J., Brown, C. R., Norley, S., Megede, J. Z., Coulibaly, C., Plesker, L., Holzhammer, S., Baier, M., Hirsch, V., and Kurth, R. (1998). Simian Immunodeficiency virus of African green monkey is apathogenic in the newborn natural host. *J AIDS and Hum. Retrov.* 18, 210-20.
755. Bostick, P., Mayne, A. E., Villinger, F., Greenberg, K. P., Powell, J. D., and Ansari, A. A. (2001). Relative resistance in development of T cell anergy in CD4+ T cells from simian immunodeficiency virus disease-resistant sooty mangabeys. *J. Immunol.* 166, 506-16.
756. Ochs, H. D., Morton, W. R., Tsai, C. C., Thouless, M. E., Zhu, Q., Kuller, L. D., Wu, Y. P., and Benveniste, R. E. (1991). Maternal-fetal transmission of SIV in macaques: Disseminated adenovirus infection in an offspring with congenital SIV infection. *J. Med. Primatol.* 20, 193-200.
757. Baskin, G. B., Murphey-Corb, M., Watson, E. A., and Martin, L. N. (1988). Necropsy findings in rhesus monkeys experimentally infected with cultured simian immunodeficiency virus (SIV)/delta. *Vet Pathol* 25(6), 456-67.
758. Chalifoux, L. V., Ringler, D. J., King, N. W., Sehgal, P. K., Desrosiers, R. C., Daniel, M. D., and Letvin, N. L. (1987). Lymphadenopathy in macaques experimentally infected with the simian immunodeficiency virus (SIV). *Amer. J. Pathol.* 128, 104-10.
759. Simon, M. A., Brodie, S. J., Sasseville, V. G., Chalifoux, L. V., Desrosiers, R. C., and Ringler, D. J. (1994). Immunopathogenesis of SIVmac. *Virus Res.* 32, 227-251.

## RESUMÉ

Après la découverte de l'infection par le VIH chez l'homme, des virus apparentés au VIH ont été retrouvés chez les primates. Deux types de modèles d'études ont été définis; modèles pathogènes représentés par l'infection SIVmac/SIVsm chez le macaque, et les modèles SIV non pathogènes développés chez les singes d'Afrique. Le niveau de la charge virale, peu élevé chez ces animaux au cours de l'infection naturelle par rapport à l'homme infecté par VIH, a été considéré pendant très longtemps comme le facteur principal responsable de la non pathogénicité chez ces singes. Le mandrill (*Mandrillus sphinx*) est un animal terrestre, largement répandu en Afrique Centrale. Une colonie de mandrills a été établie au CIRMF dans le but d'étudier la physiologie de cette espèce. Celle-ci étant naturellement infectée sans signe de pathogénicité par le SIVmnd, nous nous sommes intéressés à l'étude des facteurs liés à la résistance au SIDA dans ce modèle, et pour cela nous nous sommes fixé les objectifs suivants :

-Etablir les outils nécessaires à l'étude de l'infection SIV du mandrill et en particulier déterminer les caractéristiques des cellules du système immunitaire du mandrill :

Les anticorps utilisés pour détecter les CD (cluster de différenciation) chez les humains croisent avec ceux des mandrills. L'activité NK des mandrills est proche de celle des humains quoique légèrement élevée, cette activité n'est pas corrélée avec l'expression du CD56<sup>+</sup> et avec la promptitude à la prolifération aux antigènes non spécifiques. Enfin, nous avons montré que les mandrills possèdent des taux de cellules CD8<sup>+</sup> comparables à ceux des autres singes.

-Etudier les virus SIV infectant les mandrills de la colonie du CIRMF:

cette étude a permis de caractériser un nouveau virus que nous avons appelé SIVmnd-2, différent du SIVmnd-1 isolé en 1989. Par ailleurs nous avons montré au cours de cette étude que ces deux virus qui infectent aussi les mandrills sauvages présentent des caractéristiques virologiques différentes.

-Etudier les paramètres virologiques lors de la primo-infection puis en phase chronique de *M. Sphinx* par SIVmnd-1 :

Dans une première étape, nous avons montré que le virus SIVmnd-1 se répliquait efficacement à des niveaux similaires à ceux observés chez le modèle SIVagm chez les singes verts et le modèle SIVmac chez le macaque lors de la primo-infection. Cette forte charge virale est par la suite vigoureusement contrôlée jusqu'à un plateau d'équilibre qui perdure pour certains animaux pendant près de 20 ans. La charge virale reste cependant très forte sans évolution vers la maladie indiquant très clairement qu'il ne s'agit pas du facteur décisif de la résistance au SIDA.

- Etudier la réponse immune, humorale et cellulaire, et les corréler à la dynamique de la charge virale en primo-infection et en phase chronique :

Nous avons observé lors de la primo-infection une faible stimulation du système immunitaire légèrement corrélée avec la dynamique de la charge virale au moment de l'apparition du pic viral. Cependant, il a été noté une tendance à la baisse des CD4<sup>+</sup>. Ce qui pourrait expliquer en plus de la baisse physiologique des cellules de ce compartiment chez les singes âgés, l'apparition du SIDA après 20 années chez un seul et unique individu de la colonie sur 20 infectés à long terme.

En conclusion, nos études ont démontré que le SIVmnd-1, un virus probablement cross-transmis de l'hoesti au mandrill, s'est adapté à son nouvel hôte.

**Mots-Clefs :** SIVmnd, CD4, CD8, Charge virale plasmatique, ganglions, NK, Lymphoprolifération, mandrills.