

<b>Thesis Title</b>	Mother-to-Child Transmission of the Human Immunodeficiency Virus Type 1: Role of Neutralizing Antibodies and Molecular Characteristics of the Transmitted Variants	
<b>Author</b>	Miss Tanawan Samleerat	
<b>Degrees</b>	Ph.D. (Biomedical Science), Ph.D. (Sciences de la Vie et de la Santé)	
	Thesis under the co-directed thesis convention between Chiang Mai University and François Rabelais University of Tours	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai	Chairperson
	Prof. Dr. Francis Barin	Member
	Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi	Member
	Dr. Nicole Ngo-Giang-Huong	Member

## ABSTRACT

Maternal neutralizing antibodies (NAbs) can cross the placental barrier into the fetal bloodstream, thus protecting the infant against infection with numerous pathogens. Mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1 is a unique situation where babies are exposed to the virus in presence of passively transferred antibodies and provides opportunities to study the role of passively acquired antibodies in preventing HIV infection. Maternal antibodies are among the selective factors potentially responsible for a genetic bottleneck, and may play a role in limiting transmission of neutralization sensitive variants. In this study, we aimed at define the role of maternal NAbs in MTCT of HIV-1 and to characterize the HIV-1 envelope glycoproteins of viruses preferentially transmitted in MTCT of HIV-1.

Titers of NAbs against six primary isolates of clades B and CRF01\_AE were determined in sera from 45 transmitting mothers and 45 non-transmitting mothers matched for the main independent factors associated with MTCT in Thailand. A

lower risk of MTCT, particularly for intrapartum transmission, was associated only with higher NAb titers against the CRF01\_AE strain, MBA. The envelope glycoprotein of this strain showed an unusually long V2 domain of 63 amino acids encoding 6 potential N-linked glycosylation sites (PNGS) contributing to a higher resistance to neutralization by sera of mothers when compared to other CRF01\_AE strains, suggesting that some primary isolates may be useful indicators for identifying protective antibodies. The characteristics of the HIV-1 envelope gp120 gene were analyzed in a total of 353 sequences from 17 HIV-1-infected mother-infant pairs. We found that even if the mother had a complex viral population only viruses of a restricted subset were transmitted to the infant, independently of whether transmission occurs *in utero* or intrapartum. We did not find that shorter gp120 or fewer PNGS were characteristics of viruses transmitted from mother to infant. However, we found that a limited number of PNGS that seem to be conserved in all infant variants but are not uniformly present in mothers, particularly at positions N301 and N384, may confer an advantage on the virus to be transmitted. Moreover, we identified two cases that suggest that recombination probably contributed to adaptation of HIV-1 to its environment to be successfully transmitted from mothers to their infants. This is to our knowledge the first description of the contributing role of HIV recombination in MTCT. In addition, our data allow both to confirm, in natural *in vivo* conditions, a hot spot for recombination in the C2 region of HIV-1 envelope gene, and to suggest another hot spot in the C3 region. Therefore these studies could provide insights into the role of maternal NAb and how these contribute to modulate the transmitted viruses. They may provide critical insights into the antibody responses that are needed for effective vaccines and other prophylactic.

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การถ่ายทอดเชื้อเอชไอวีไทป์หนึ่งจากแม่สู่ลูก: บทบาทของนิวตราไลท์ซึ่งแอนติบอดี และลักษณะทางโมเลกุลของไวรัสที่ถูกถ่ายทอด

**ผู้เขียน** นางสาว ธนวรรณ ลำลือรัตน์

**ปริญญา** วิทยาศาสตร์ดุขฎิบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์), Ph.D. (Sciences de la Vie et de la Santé)

วิทยานิพนธ์ภายใต้ข้อตกลงการร่วมให้คำปรึกษาวิทยานิพนธ์ระหว่างมหาวิทยาลัยเชียงใหม่และมหาวิทยาลัยฟรอนซ์วัวร์-คาบอเลส์ เดอ ตูร์

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

ผศ.ดร.ปราณี ลีชนะชัย

ประธานกรรมการ

Prof. Dr. Francis Barin

กรรมการ

ผศ.ดร.วาสนา ศิริรังษี

กรรมการ

Dr. Nicole Ngo-Giang-Huong

กรรมการ

**บทคัดย่อ**

ในระหว่างการตั้งครรภ์นั้น แอนติบอดีของแม่สามารถผ่านข้ามรกเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดของทารกที่อยู่ในครรภ์ ซึ่งแอนติบอดีที่ทารกได้รับจากแม่ในขณะที่อยู่ในครรภ์นี้จะสามารถป้องกันทารกเมื่อแรกเกิดจากการติดเชื้อได้หลายชนิด ด้วยเหตุนี้เมื่อแม่ที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีถ่ายทอดไวรัสไปสู่ลูก ลูกก็จะได้สัมผัสกับไวรัสในขณะที่มีแอนติบอดีของแม่อยู่ในร่างกายแล้ว ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้ก็น่าที่จะมีบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อเอชไอวีจากแม่สู่ลูกได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีจากแม่เหล่านี้ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ของไวรัสที่ถูกถ่ายทอดไปยังลูก ซึ่งสายพันธุ์ที่ถูกนิวตราไลท์หรือถูกยับยั้งโดยแอนติบอดีของแม่จะถูกจำกัดไม่ให้ถ่ายทอดไปยังลูก ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลไกของนิวตราไลท์ซึ่งแอนติบอดีของแม่ในการป้องกันการติดเชื้อเอชไอวีจากแม่สู่ลูก และศึกษาลักษณะทางโมเลกุลของไกลโคโปรตีนที่อยู่บนเปลือกของไวรัสที่ถูกถ่ายทอดไปยังลูก

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจวัดปริมาณนิวตราไลท์ซึ่งแอนติบอดีในซีรัมของแม่ที่ถ่ายทอดเชื้อเอชไอวีไทป์หนึ่งสู่ลูกจำนวน 45 ราย และแม่ที่ไม่ได้ถ่ายทอดเชื้อไวรัสจำนวน 45 ราย โดยคัดเลือกผู้ติดเชื้อจากการเปรียบเทียบปริมาณไวรัสในพลาสมา, จำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิด CD4+

ลิ้มโฟลด์, และระยะเวลาที่ได้รับบาดานไวรัส ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายทอดเชื้อเอชไอวี จากแม่สู่ลูก ต่อการทดสอบด้วยไวรัสเพาะเลี้ยงจำนวน 6 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยไวรัสสับไทป์บี จำนวน 3 สายพันธุ์ และ CRF01\_AE จำนวน 3 สายพันธุ์ ผลจากการตรวจวัดพบว่านิวตราไลท์ซึ่งแอนติบอดีต่อไวรัส MBA (ไวรัส CRF01\_AE ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ระบาดมากอยู่ในประเทศไทย) ที่มีปริมาณสูงนั้นจะมีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูก โดยเฉพาะเมื่อการถ่ายทอดเกิดขึ้นในช่วงระหว่างคลอด (intrapartum transmission) ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส CRF01\_AE จำนวน 3 สายพันธุ์นั้น พบว่า MBA มีความยาวของส่วน V2 ของ gp120 มากกว่าสายพันธุ์อื่น คือมีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 63 และมีตำแหน่งของการเติมน้ำตาล (N-linked glycosylation) 6 ตำแหน่ง ซึ่งพบว่าลักษณะดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องทำให้ไวรัส MBA มีความต้านทานต่อการนิวตราไลท์โดยแอนติบอดีมากกว่าไวรัส CRF01\_AE อีกสองสายพันธุ์ ทำให้สรุปได้ว่าไวรัสเพาะเลี้ยงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่เหมาะสมกับการนำมาทดสอบหาปริมาณของนิวตราไลท์ซึ่งแอนติบอดี

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางโมเลกุลของไวรัสเอชไอวีที่สามารถถ่ายทอดจากแม่มายังลูกได้ โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน gp120 ซึ่งเป็นยีนของไกลโคโปรตีนที่อยู่บนเปลือกของไวรัส จำนวนทั้งสิ้น 353 ลำดับ จากคู่มือ-ลูกที่ติดเชื้อเอชไอวีไทป์หนึ่ง จำนวน 17 คู่ ซึ่งพบว่าไวรัสที่แยกได้จากแม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากหลายมากกว่าไวรัสที่แยกได้จากลูก โดยไวรัสที่ถูกถ่ายทอดไปยังลูกนั้นเป็นประชากรส่วนน้อยของไวรัสในแม่ และไม่มี ความแตกต่างไม่ว่าการถ่ายทอดจะเกิดขึ้นระหว่างตั้งครรภ์ (*in utero* transmission) หรือระหว่างคลอด และไม่พบว่าไวรัสที่ถูกถ่ายทอดจะมี gp120 สั้นหรือมีตำแหน่งของการเติมน้ำตาลน้อยแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามพบว่าตำแหน่งที่ถูกเติมน้ำตาลบางตำแหน่ง ได้แก่ N301 และ N384 นั้น จะพบในไวรัสที่แยกได้จากลูกเกือบทั้งหมด แต่จะพบไม่มากในไวรัสที่แยกได้จากแม่ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวมีความสำคัญต่อไวรัสที่ถูกคัดเลือกให้ถ่ายทอดไปยังลูก ยิ่งไปกว่านั้นผู้วิจัยยังได้ค้นพบว่ามีแม่-ลูกที่ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 2 คู่ จาก 17 คู่ที่ได้ศึกษาข้างต้น มีการถ่ายทอดเชื้อไวรัสเอชไอวีลูกผสมจากแม่ไปยังลูก ซึ่งชี้ให้เห็นความสามารถที่ซับซ้อนของไวรัสเอชไอวีที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสถานะการณ์จนสามารถถูกคัดเลือกให้ถ่ายทอดไปยังลูกได้ ซึ่งการค้นพบนี้เป็นครั้งแรก ที่พบว่าไวรัสลูกผสมสามารถถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูกได้ และพบว่าตำแหน่งที่เกิดการผสมกันนั้นอยู่บริเวณ C2 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกพบมากจากการศึกษาไวรัสในหลอดทดลอง และตำแหน่งบริเวณ C3 ของ gp120

ผลของการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลที่สามารถอธิบายกลไกของนิวตราไลท์ซึ่งแอนติบอดีของแม่ในการป้องกันการติดเชื้อจากแม่สู่ลูก และสามารถอธิบายกลไกของไวรัสเอชไอวีไทป์หนึ่งในการปรับตัวให้สามารถถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูกได้ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้จะนำไปสู่ขั้นตอนต่อไปของการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำแอนติบอดีมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี และเป็นข้อมูลในการพัฒนาวัคซีนที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี

**Titre de la thèse** Transmission Mère-Enfant du Virus de l'Immunodéficience Humaine de Type 1 : Rôle des Anticorps Neutralisants et Caractéristiques Moléculaires des Variants Transmis

**Auteur** Mademoiselle Tanawan Samleerat

**Diplôme** Ph.D. (Biomedical Science), Ph.D. (Sciences de la Vie et de la Santé)

Thesis en co-tutelle : Chiang Mai University et Université François Rabelais de Tours

**Thèse Comité Consultatif**

Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai

Président

Prof. Dr. Francis Barin

Membre

Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi

Membre

Dr. Nicole Ngo-Giang-Huong

Membre

**RÉSUMÉ**

Les anticorps neutralisants d'origine maternelle sont régulièrement associés à la protection du fœtus ou du nouveau-né dans bon nombre d'infections virales. Les données disponibles dans la littérature pour ce qui concerne le rôle de ces anticorps neutralisants dans la transmission mère-enfant (TME) du VIH-1 sont cependant relativement contradictoires, et quelques études moléculaires tendent à montrer que la TME du VIH-1 est souvent caractérisée par l'acquisition d'une population virale génétiquement restreinte chez l'enfant, suggérant une pression de sélection de certains variants maternels.

Au cours de cette thèse réalisée sur une population thaïlandaise, les anticorps neutralisants ont en effet été recherchés (et quantifiés) vis à vis de 6 isolats primaires de sous-types B (n=3) et CRF01\_AE (n=3) chez 45 mères transmetteuses et 45 mères non-transmetteuses appariées sur la charge virale plasmatique, le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup>, et la durée de la chimioprophylaxie. Nous avons notamment montré que la présence et les titres élevés d'anticorps neutralisant l'isolat MBA (sous-type CRF01\_AE) étaient associés un risque moindre de TME du VIH-1. Le

séquençage du gène *env* de cet isolat a révélé quelques caractéristiques moléculaires, tout particulièrement une large insertion fortement glycosylée dans la région V2. Cet ensemble de travaux a confirmé le rôle protecteur de certains anticorps neutralisants dans la TME du VIH-1, a permis de suggérer que certaines souches seraient de bons indicateurs d'anticorps neutralisants associés à la protection, et a confirmé le rôle de la région V2 de l'enveloppe virale en tant que cible des anticorps neutralisants.

Nous avons analysé les caractéristiques moléculaires des virus transmis dans le contexte de la TME au sein d'une population parfaitement caractérisée sur le plan bioclinique, infectée uniquement par des souches de sous-type CRF01-AE. Dix-sept couples mère-enfant ont été étudiés, 6 enfants ayant été infectés *in utero* et 11 enfants en période périnatale. Les séquences du gène *env* (région couvrant la quasi-totalité de la gp120) ont été amplifiées et séquencées après clonage. Un total de 353 clones étaient disponibles pour l'analyse moléculaire. Nos résultats confortent les données en faveur de la transmission à l'enfant d'une population virale restreinte génétiquement malgré la présence d'une population virale complexe chez la mère, et ceci quelle que soit la période de transmission, *in utero* ou intrapartum. Une gp 120 plus compacte et une moindre glycosylation ne sont pas des caractéristiques des virus transmis de la mère à l'enfant. Cependant, deux sites de N-glycosylation (N301 et N384) semblent être sélectionnés chez les virus transmis, ce qui pourrait conforter l'implication du « bouclier glycanique » de la gp120 dans l'avantage sélectif. Ce travail a également permis d'identifier pour la première fois deux cas de TME liés à des variants issus de recombinaisons entre variants maternels, suggérant également la contribution de la recombinaison dans la sélection de variants transmissibles. L'analyse fine de ces recombinaisons a confirmé la présence d'un « hot spot » dans la région C2 du gène *env*, et a révélé pour la première fois un second « hot spot » dans la région C3.

En conclusion, les informations obtenues nous ont permis de confirmer le rôle possiblement protecteur de certains anticorps neutralisants dans le contexte de la transmission mère-enfant du VIH-1, et d'identifier des événements moléculaires contribuant à la sélection de variants transmissibles dans ce même contexte. A long terme, la connaissance de telles propriétés pourrait permettre de contribuer à une démarche rationnelle menant vers l'obtention de vaccins préventifs.