

Chapitre 2

ORIGINE ET ÉVOLUTION DU VIH

Marc Choisy

*UMR UM/CNRS/IRD, maladies infectieuses et vecteurs :
écologie, génétique, évolution et contrôle, Hanoï, Vietnam
Oxford University Clinical Research Unit, Hanoï, Vietnam*

Introduction

Le sida fait partie, avec le paludisme et la tuberculose, des trois grandes maladies prioritaires pour l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Cette maladie causée par les VIH s'est répandue dans l'ensemble des populations humaines depuis le début des années 1980 et infecte aujourd'hui 2 à 3 millions de personnes par an, essentiellement en Afrique subéquatoriale (UNAIDS, 2013). Le nombre total de personnes infectées depuis le début de la pandémie s'élève à 80 millions (dont 25 millions de morts) et la prévalence actuelle est de 35 millions, essentiellement en Afrique subéquatoriale encore une fois (UNAIDS, 2013). Il n'existe à ce jour encore aucun vaccin protégeant contre l'infection. Le développement de la maladie peut être substantiellement retardé grâce aux trithérapies utilisées depuis les années 1990 mais ces traitements restent à un coût extrêmement élevé et mettent les patients dans des conditions de vie très pénibles. Les analyses de phylogénie et d'évolution moléculaire de ces dernières années ont permis d'identifier l'origine du virus du sida, de caractériser sa dispersion mondiale, d'expliquer la durée de la période asymptomatique et le déclenchement de la maladie, ses modes de transmission, ainsi que ses conséquences sur l'évolution humaine.

1. Un organisme vivant à l'évolution la plus rapide connue

Le VIH fait partie de la famille des rétrovirus. La caractéristique de ces virus tient à leur génome qui se trouve sous forme d'acide ribonucléique messager (ARNm). Son cycle de vie ne peut être effectué que par la rétrotranscription de cet ARNm en acide désoxyribonucléique (ADN) qui est ensuite intégré dans le génome nucléaire de la cellule hôte d'où il est alors exprimé grâce à la machinerie moléculaire de cette dernière. L'étape de rétrotranscription est réalisée grâce à une enzyme propre aux rétrovirus : la *reverse transcriptase*. Le génome des VIH est constitué de deux brins d'ARNm (génome diploïde) d'environ 10 000 bases chacun et contient trois gènes majeurs : *gag* codant les protéines de la capsid, *pol* codant les différentes enzymes dont la *reverse transcriptase* mentionnée ci-

dessus, et *env* codant les protéines de l'enveloppe (les VIH sont des virus enveloppés, c'est-à-dire que leur capsidie protéique est entourée d'une membrane lipidique). Une des caractéristiques des VIH souvent négligée est l'extrême rapidité de leur réplication, avec une production d'en moyenne 10^{10} nouveaux virions par jour chez un patient infecté. Par ailleurs, la moindre stabilité de l'ARN par rapport à l'ADN, ainsi que les nombreuses erreurs produites par la *reverse transcriptase* sont responsables d'un taux de mutation particulièrement élevé (environ une mutation/génome/cycle). Enfin, le génome diploïde des VIH présente des taux de recombinaison particulièrement élevés (7-30 recombinaisons/génome/cycle). Cette réplication rapide du virus couplée à des taux de mutation et de recombinaison élevés confère aux VIH un potentiel évolutif extrêmement rapide. Ce potentiel évolutif rapide, exposé à des pressions de sélection fortes de la part du système immunitaire (voir ci-dessous) fait des VIH les organismes vivants connus ayant les vitesses d'évolution les plus rapides (Rambaut *et al.*, 2004).

2. Une origine zoonotique des VIH

L'émergence soudaine du sida au début des années 1980 a posé un certain nombre de questions quant à son origine. De très nombreuses hypothèses et spéculations ont été proposées et seules les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier l'histoire évolutive des VIH la plus plausible. Les VIH font partie du genre des lentivirus dont le nom rend compte de la longue période d'incubation précédant le développement de la maladie. Ce genre comprend cinq sérogroupes infectant des groupes de mammifères différents : bovins, équins, félins, ovins/caprins et primates. Ce dernier groupe comprend naturellement les VIH mais aussi les VIS (virus d'immunodéficience simienne). Les VIS sont des virus proches des VIH mais infectant les primates africains. Les analyses phylogénétiques sur les VIS ont montré que ces virus sont phylogénétiquement organisés par espèce hôte, révélant ainsi que chaque espèce de primate africain est infectée par un virus spécifique (*figure 1*). Des analyses phylogénétiques sur les VIS et VIH combinés montrent que les VIH ne sont pas monophylétiques, distinguant ainsi deux types de VIH : les VIH-1 et les VIH-2. Par ailleurs, la proximité phylogénétique des VIH-1 et des VIS_{cpz} (VIS infectant les chimpanzés), d'une part, et des VIH-2 et des VIS_{sng} (VIS infectant les singes verts mangabey), d'autre part,

Histoire de quelques grandes maladies

suggèrent très nettement que VIH-1 et VIH-2 sont issus des VIS_{cpz} et VIS_{smg} passant respectivement des chimpanzés et des singes verts à l'homme (*figure 1*, Keele *et al.*, 2006). La consommation fréquente de «viande de brousse» (dont primates) en Afrique de l'Ouest rend tout à fait possible des transferts de parasites entre faune sauvage et homme, soit au cours de morsure d'animaux vivants, soit au cours de dépeçage d'animaux morts (Peeters *et al.*, 2002). L'analyse détaillée de ces phylogénies a montré en particulier qu'il y a eu pas moins de six événements indépendants de transferts de VIS à l'homme (Sharp et Hanh, 2011). Enfin, ces analyses ont également permis de dater ces événements de transferts jusqu'au début du XX^e siècle (Worobey *et al.*, 2008), en accord avec le plus vieux cas connu d'infection humaine par VIH datant de 1959 (soit plus de vingt ans avant le démarrage de la pandémie que l'on connaît aujourd'hui (Zhu *et al.*, 1998). Ces datations anciennes constituent notamment le meilleur argument réfutant l'origine des VIH dans le vaccin contre la poliomyélite, hypothèse proposée dans les années 1990 et ayant fait couler beaucoup d'encre sur la sécurité des essais vaccinaux (Hooper, 1999).

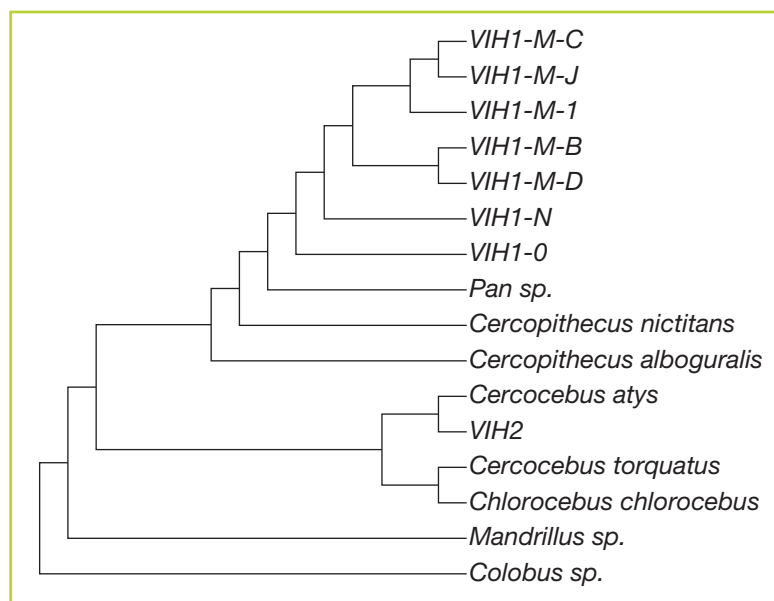


FIGURE 1 Dendrogramme des VIH et VIS. Les VIS sont représentés par les noms de leurs espèces hôtes.

3. Diversité mondiale des VIH

Les analyses phylogénétiques plus détaillées des VIH révèlent une extrême diversité génétique. Le VIH-1 est ainsi divisé en trois groupes (par ordre de découverte: M pour « main » en anglais, N pour « non-M », O pour « outlier » en anglais). Les groupes N et O sont confinés à l'Afrique centrale de l'Ouest tandis que le groupe M est le groupe responsable de la pandémie et est ainsi retrouvé partout dans le monde. Ces groupes sont ensuite eux-mêmes subdivisés en sous-types. Le groupe M comprend ainsi les sous-types A à K, par ordre de découverte. Le sous-type B est celui responsable de la pandémie et est le sous-type dominant retrouvé en Europe, aux Amériques, en Asie et en Australie. Le sous-type C est retrouvé en Inde et en Chine et tous les autres sous-types sont confinés à l'Afrique. Le VIH-2 est lui entièrement confiné à l'Afrique centrale de l'Ouest. Le fait que cette région de l'Afrique est celle contenant la plus forte diversité mondiale de VIH est un argument en faveur d'une origine africaine des VIH. Par ailleurs, le fait que seuls les primates africains soient naturellement infectés par les VIS est un argument supplémentaire en faveur d'une origine zoonotique des VIH. La diversité des VIH n'est pas seulement génétique, elle est également phénotypique. Ainsi, les VIH-2 sont caractérisés par des forces de transmission plus faibles que les VIH-1, des durées de latence plus longues que les VIH-1 et des sévérités (c'est-à-dire taux de mortalité) plus faibles que les VIH-1. Nous retrouvons, à de plus faibles degrés, une telle variabilité des traits épidémiologiques entre les différents groupes et sous-types des deux types de VIH. Le sous-type B du groupe M de VIH-1 est particulièrement transmissible et virulent, ce qui pourrait expliquer qu'il soit à l'origine de la pandémie alors que l'immense majorité des autres VIH est restée confiné à leur zone géographique d'origine, l'Afrique centrale de l'Ouest. Une telle diversité des traits épidémiologiques est également documentée parmi les VIS. Les VIS présentent des prévalences dans les populations naturelles de primates plus élevées que les VIH dans les populations humaines et des virulences qui semblent plus faibles. L'observation selon laquelle les VIS ayant eu une longue coévolution avec leurs hôtes primates provoqueraient des sévérités de maladies plus faibles que les VIH ayant eu une courte coévolution avec leur hôte humain serait en accord avec la « sagesse traditionnelle » qui prédit que les parasites évolueraient vers une diminution de virulence (Ewald, 1994). Les comparaisons de virulence entre espèces hôtes différentes sont toutefois à prendre avec précaution, notamment lorsque les maladies en question sont caractérisées par

Histoire de quelques grandes maladies

des durées de latence longues (comme pour les lentivirus) et que les espèces hôtes sont caractérisées par des espérances de vie très différentes (comme c'est le cas lorsque l'on compare primates et hommes) : il est possible que les VIS n'aient tout simplement pas le temps de tuer les primates avant qu'ils ne meurent d'autres causes naturelles.

4. Évolution intrahôte des VIH et développement de la maladie

Les VIH infectent les lymphocytes CD4+ (cluster de différenciation 4+), cellules jouant un rôle central dans la réponse du système immunitaire aux infections. Une infection par le VIH présente une succession de plusieurs phases caractérisées immunologiquement et cliniquement. L'infection se caractérise par des symptômes de types grippaux (par exemple fièvre), une augmentation de la concentration virale dans l'organisme et une diminution conjointe de la concentration des lymphocytes CD4+ (les VIH prédatant en quelque sorte ces cellules). Cette première phase de quelques semaines est suivie par une deuxième phase, la plus longue (une dizaine d'années), caractérisée par une période de latence asymptomatique, une légère remontée de la concentration des lymphocytes CD4+ et sa stabilisation à un niveau intermédiaire, ainsi qu'une diminution de la concentration virale et sa stabilisation à de faibles niveaux. Enfin, la dernière phase est l'apparition du sida avec un effondrement du nombre de lymphocytes CD4+ et une explosion de la concentration virale. Le système immunitaire déprimé devient une porte ouverte aux infections opportunistes (par exemple tuberculose, première d'entre elles; voir le chapitre 5 «*Mycobacterium tuberculosis*: écologie et évolution d'une bactérie humaine») dont le patient meurt rapidement. Ces densités constantes observées durant la période de latence ont longtemps donné l'impression d'une stase biologique caractérisant cette période, les mécanismes responsables de la fin de cette période et du début du sida restant alors incompris. Dans les années 1990, Nowak *et al.* (1991) ont mis en évidence que cette période d'apparente stase est, en fait, caractérisée par des activités virale et immunologique extrêmement intenses où VIH et système immunitaire se trouvent engagés dans une course aux armements extrêmement rapide: proces-

sus de coévolution de type « reine rouge » (Ridley, 2003) où l'évolution antigénique permet aux VIH d'échapper au système immunitaire et l'évolution immunogénique permet au système immunitaire de contenir la multiplication virale. L'équilibre de concentration observé est donc un équilibre dynamique et non pas statique. Lorsque la diversité antigénique virale passe au-dessus d'un certain seuil, le système immunitaire ne semble plus pouvoir suivre, perdant ainsi la course contre le virus. Le sida apparaît alors. Ce mécanisme, proposé et vérifié par Nowak *et al.* (1991), est connu sous le nom de « théorie du seuil de diversité ». Ce seuil de diversité est assez peu variable d'un patient à l'autre, expliquant ainsi que la durée de la période de latence (une dizaine d'années environ) soit également peu variable d'un patient à l'autre. Cette durée est par ailleurs un trait phénotypique qui semble dépendre beaucoup plus de facteurs viraux que de facteurs liés aux patients (Alizon *et al.*, 2010 ; Fraser *et al.*, 2014).

5. Bouclier de sucres : un mécanisme d'échappement au système immunitaire

Les VIH infectent certaines cellules du système immunitaire, majoritairement les lymphocytes CD4+, c'est-à-dire les lymphocytes caractérisés par la présence de récepteurs CD4 à la surface de leur membrane. L'infection de ces cellules par les VIH commence toujours par l'amarrage des protéines de l'enveloppe du virus (celles codées par le gène *env*, voir ci-dessus) aux récepteurs CD4 des lymphocytes CD4+ (*figure 2*). Une fois l'amarrage réalisé, les membranes du virus et du lymphocyte fusionnent, la capsid virale pénètre à l'intérieur de la cellule hôte et l'infection commence. Cet amarrage est un mécanisme de type clé-serrure extrêmement précis et ne supporte donc aucune mutation qui pourrait perturber la conformation tridimensionnelle de la protéine membranaire, au risque de rendre l'arrimage de cette protéine aux récepteurs membranaires impossible. Cependant, de par leur position externe (c'est-à-dire dans la membrane virale), ces protéines d'arrimage sont également les protéines virales les plus visibles par le système immunitaire, et en particulier une cible privilégiée des anticorps. La pression de sélection exercée par ces derniers pousse ainsi cette protéine à sans cesse muter. Cette protéine membranaire virale est donc soumise à deux pres-

Histoire de quelques grandes maladies

sions de sélection diamétralement opposées : une pression de sélection conservatrice, tendant à éliminer toutes les mutations qui pourraient perturber sa fonction d'arrimage aux récepteurs CD4 des cellules hôtes, et une pression de sélection au contraire diversifiante, tendant à favoriser toutes les mutations qui pourraient permettre au virus d'échapper aux anticorps neutralisants. Le gène *env* codant cette protéine membranaire étant de taille relativement réduite (environ 2 500 paires de base), il apparaît difficile de faire face à ces deux pressions de sélection opposées à la fois. L'hypothèse du bouclier de sucre est un mécanisme original qui a été proposé par Gaschen *et al.* (2002) et vérifié notamment par l'analyse détaillée de l'évolution moléculaire de ce gène (Choisy *et al.*, 2004). Cette dernière a montré que le gène *env* est globalement caractérisé par une intense sélection conservatrice, assurant ainsi le maintien de la fonction d'arrimage aux récepteurs CD4 de la protéine membranaire virale. Seul un très faible nombre de sites (c'est-à-dire les acides aminés de la protéine) se trouve sous sélection diversifiante extrêmement intense. Ces sites n'ont que très peu d'influence sur la conformation tridimensionnelle (et donc la fonction d'arrimage) de la protéine membranaire virale. Plus surprenant cependant, ces sites ne se trouvent pas du tout associés aux épitopes (les portions de protéines reconnues par le système immunitaire) de la protéine membranaire virale. Ils sont en revanche associés aux sites dits de glycosylation. Ces derniers correspondent à des acides aminés permettant l'accrochage de molécules de sucre volumineuses à la surface de la protéine. L'encombrement stérique de ces molécules peut substantiellement gêner l'accès des anticorps aux épitopes de la protéine virale (jouant ainsi le rôle d'un véritable bouclier) sans pour autant gêner la fonction d'arrimage de la protéine virale. La rapide évolution diversifiante sur ces sites de glycosylation a pour effet de constamment modifier la conformation de ce bouclier, lui permettant ainsi d'échapper aux anticorps dont l'évolution peut potentiellement leur donner accès aux épitopes pour une conformation du bouclier donnée. Ces molécules de sucres volumineuses offrent aux virus la possibilité, en quelque sorte, d'amplifier l'effet des mutations qui apparaissent sur les rares sites de glycosylation. En résumé, la stratégie évolutive permettant aux VIH de répondre à deux pressions de sélection opposées consiste à concentrer une évolution diversifiante intense sur très peu de sites (les effets des mutations y étant très amplifiés par les molécules de sucres accrochées à ces sites), le reste des sites (l'immense majorité d'entre eux) étant sous évolution conservatrice. L'évolution

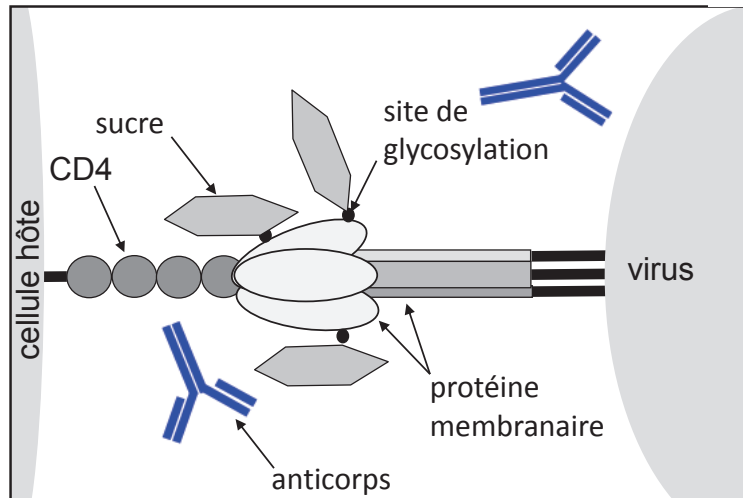


FIGURE 2 | Mécanisme d'arrimage du VIH à la surface de la cellule hôte. L'accrochage des anticorps à la surface de la protéine membranaire est empêché par les molécules de sucres volumineuses. Ces dernières sont accrochées à la protéine membranaire au niveau des sites de glycosylation. L'évolution diversifiante sur ces sites change constamment la conformation tridimensionnelle de ce bouclier de sucres, empêchant ainsi les anticorps de trouver un accès aux épitopes.

conservatrice générale permet à la protéine virale de conserver sa fonction d'arrimage et les quelques sites de glycosylation sous évolution diversifiante permettent à la protéine virale de constamment échapper aux anticorps (*figure 2*).

6. Vers une évolution de la résistance contre le VIH ?

La sagesse traditionnelle mentionnée ci-dessus stipule que les parasites évoluent vers une diminution de la virulence des parasites sur leur hôte : une virulence trop élevée et entraînant des taux de mortalité des hôtes trop forts nuit aux parasites qui dépendent de leurs hôtes pour leur survie et leur transmission (Anderson et May, 1982). Peu de données à ce jour vérifient cette théorie. La comparaison des virulences faibles des VIS (longue coévolution avec leurs hôtes

Histoire de quelques grandes maladies

primates) et des VIH (courte coévolution avec leurs hôtes humains), mentionnée ci-dessus, serait une des rares vérifications de cette théorie. À noter que les taux de mortalité des hôtes dépendent certes de la virulence de leurs parasites (évolution parasitaire), mais également de la résistance des hôtes aux parasites (évolution des hôtes). Le meilleur exemple illustrant ce deuxième effet est l'introduction du virus de la myxomatose dans les populations australiennes de lapins. Les lapins ont été introduits accidentellement en Australie au XIX^e siècle, causant d'importants dommages agricoles. Dans un souci d'exterminer ou du moins de réduire ces populations au minimum, des scientifiques ont introduit dans les années 1950 le virus de la myxomatose dans les populations australiennes de lapins. L'effet délétère de ce virus sur les populations de lapins fût extrêmement élevé durant les quelques années suivant l'introduction du virus (forte contagiosité et forte létalité : 99 % de mortalité dans les premières années). Toutefois, en très peu de temps, les populations de lapins ont développé une résistance à partir de très peu d'individus naturellement résistants au virus de la myxomatose. En deux décennies, ce dernier n'était plus efficace pour contrôler les populations australiennes de lapins (Fenner et Fantini, 1999). Cet exemple de la myxomatose illustre très bien l'effet de la pression de sélection exercée par les parasites sur leurs hôtes. On peut donc se demander si une telle évolution est actuellement en action dans le cadre du VIH. Une piste dans ce sens a été découverte dans les années 1990 : une délétion de 32 paires de bases sur le gène *CCR5* des lymphocytes (codant un autre récepteur membranaire) semble les rendre moins sensibles à une infection par les VIH (Samson *et al.*, 1996) et ainsi retarder considérablement l'apparition du sida chez les séropositifs. Curieusement, la fréquence de cette délétion est beaucoup plus importante dans les populations européennes qu'africaines ou asiatiques. Une hypothèse expliquant cette observation serait que cette délétion a été sélectionnée au cours d'épidémies précédentes, notamment celle de peste noire qui a balayé l'Europe au XIV^e siècle (Martinson *et al.*, 1997).

Les approches évolutives de l'étude du VIH ont permis de mieux comprendre les mécanismes régissant l'épidémiologie du sida et la progression de la maladie. L'évolution extrêmement rapide de ce virus est responsable d'une importante diversité de souches différentes qui circulent aujourd'hui (évolution interhôte), rendant le développement d'un vaccin efficace si difficile. Elle est également responsable des échecs thérapeutiques, le virus finissant toujours par contourner l'action des médicaments. L'utilisation combinée de plusieurs médicaments à la

fois (trithérapie) permet de faire face à cette évolution rapide. L'accumulation de données génétiques de plus en plus précises et abondantes nous permettra de mieux en mieux comprendre l'évolution du virus, prérequis nécessaire aux succès vaccinaux et thérapeutiques.

Références

Alizon, S., von Wyl, V., Stadler, T., Kouyos, R.D., Yerly, S., Hirschel, B., Böni, J., Shah, C., Klimkait, T., Furrer, H., Rauch, A., Vernazza, P.L., Bernasconi, E., Battegay, M., Bürgisser, P., Telenti, A., Günthard, H.F., Bonhoeffer, S., Study, S.H.C. (2010). Phylogenetic approach reveals that virus genotype largely determines HIV set-point viral load. *PLoS Pathogens*, 6, p. e1001123.

Anderson, R.M., May, R.M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85, pp. 411-426.

Choisy, M., Woelk, C.H., Guégan, J.-F., Robertson, D.L. (2004). Comparative study of adaptive molecular evolution in different human immunodeficiency virus groups and subtypes. *Journal of Virology*, 78, pp. 1962-1970.

Ewald, P.W. (1994). *Evolution of Infectious Disease*. Oxford: Oxford University Press.

Fraser, C., Lythgoe, K., Leventhal, G.E., Shirreff, G., Hollingsworth, T.D., Alizon, S., Bonhoeffer, S. (2014). Virulence and pathogenesis of HIV-1 infection: an evolutionary perspective. *Science*, 343, p. 1243727.

Fenner, F., Fantini, B. (1999). Biological control of vertebrate pests: the history of myxomatosis, a experiment in evolution. Oxfordshire: CABI Publishing.

Gaschen, B., Taylor, J., Yusim, K., Foley, B., Gao, F., Lang, D., Novitsky, V., Haynes, B., Hahn, B.H., Bhattacharya, T., Korber, B. (2002). Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*, 296, pp. 2354-2360.

Hooper, E. (1999). *The River: A Journey to the Source of HIV And AIDS*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Keele, B.F., Heuverswyn, F.V., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E.M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J.F.Y., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Peeters, M., Hahn, B.H. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, 313, pp. 523-526.

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

Histoire de quelques grandes maladies

Nowak, M.A., Anderson, R.M., McLean, A.R., Wolfs, T.F., Goudsmit, J., May, R.M. (1991). Antigenic diversity thresholds and the development of AIDS. *Science*, 254, pp. 963-969.

Peeters, M., Courgnaud, V., Abela, B., Auzel, P., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Loul, S., Liegeois, F., Butel, C., Koullagna, D., Mpoudi-Ngole, E., Shaw, G.M., Hahn, B.H., Delaporte, E. (2002). Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerging Infectious Diseases*, 8, pp. 451-457.

Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K.A., Holmes, E.C. (2004). The causes and consequences of HIV evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, pp. 52-61.

Ridley, M. (2003). *The red queen: sex and the evolution of human nature*. New York: Harper Perennial.

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., Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382, pp. 722-725.

Sharp, P.M., Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1, p. a006841.

UNAIDS (2013). *Global Report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013*.

Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D.E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J.J., Kabongo, J.M., Kalengayi, R.M., Van Marck, E., Thomas, M., Gilbert P., Wolinsky, S.M. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, 455, pp. 661-664.

Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., Ho, D.D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*, 391, pp. 594-597.