



HAL
open science

Génotoxicité de prophylaxies antirétrovirales administrées à des nourrissons nés de mères infectées par le Virus de l'Immunodéficience Humaine pour prévenir sa transmission par l'allaitement

Audrey Anouilh

► **To cite this version:**

Audrey Anouilh. Génotoxicité de prophylaxies antirétrovirales administrées à des nourrissons nés de mères infectées par le Virus de l'Immunodéficience Humaine pour prévenir sa transmission par l'allaitement. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT055 . tel-03197840

HAL Id: tel-03197840

<https://theses.hal.science/tel-03197840>

Submitted on 14 Apr 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche Pathogénèse et Contrôle des Infections Chroniques (PCCI – UMR 1058)

Génotoxicité de prophylaxies antirétrovirales administrées à des nourrissons nés de mères infectées par le Virus de l'Immunodéficience Humaine pour prévenir sa transmission par l'allaitement

Présentée par Audrey MONNIN

Le 16 décembre 2020

Sous la direction de Jean-Pierre MOLES

Devant le jury composé de

Philippe VAN DE PERRE, PU-PH, INSERM UMR1058, Université de Montpellier

Josiane WARSZAWSKI, MCU-PH, INSERM U1018, Université Paris-Saclay

Julie STEFFANN, PU-PH, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris

Pascal REYNIER, PU-PH, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers

Mireille LAFORGE, CR, INSERM UMR1124, Université Paris-Descartes

Jean-Pierre MOLES, CR, INSERM UMR1058, Université de Montpellier

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Résumé

L'universalisation des traitements antirétroviraux (ARV) couplée à l'augmentation de la couverture ARV chez les femmes enceintes et allaitantes infectées par le VIH voit l'émergence d'une population grandissante d'enfants non infectés nés de mères séropositives, exposés à la fois au VIH et aux ARV maternels de la conception à la petite enfance. Si l'impact de ces expositions questionne sur la santé de ces enfants et fait l'objet de maintes études, la prophylaxie ARV postnatale qui leur ait administrée dans le cadre de la prévention de la transmission mère-enfant (TME) du VIH nécessite elle aussi être rigoureusement évaluée, ces ARV restant donnés à des enfants non infectés. Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont consisté à évaluer la toxicité génomique aiguë et sur le long terme du lopinavir/ritonavir (LPV/r) ou de la lamivudine (3TC) utilisés en prophylaxie infantile pendant un an pour prévenir la TME du VIH par l'allaitement lors de l'essai PROMISE PEP mené dans quatre pays d'Afrique Sub-saharienne (Afrique du Sud, Burkina Faso, Ouganda et Zambie) entre novembre 2009 et mai 2012. Si cette prophylaxie étendue à toute la période de l'allaitement a montré son efficacité, avec des taux de transmission à un an de 1.4% et 1.5% pour le LPV/r et le 3TC respectivement, les recommandations actuelles de l'Organisation Mondiale de la Santé préconisent cependant une prophylaxie à base de névirapine (NVP) ou d'azidothymidine combinée à la NVP plafonnée à 12 semaines. Nos travaux indiquent que les deux prophylaxies se trouvaient associées à une prévalence importante d'enfants exposés non infectés présentant une déplétion de l'ADN mitochondrial (diminution du nombre de copies supérieure ou égale à 50% de la valeur initiale) au cours de la première année de vie. Ils ont également mis en évidence la présence d'ADN mitochondrial délétés chez la quasi-totalité des enfants dès l'initiation de la prophylaxie, démontrant ainsi une forte instabilité génomique. Toutefois, aucune association avec la croissance et le développement neuro-psychomoteur de ces enfants à 6 ans n'a été mise en évidence, alors que la déplétion ne persistait plus à cet âge-là et que les délétions sont irréversibles. Le raccourcissement de la longueur des télomères observé à un an n'a quant à lui montré aucune association avec les deux ARV et n'a eu aucun impact sur la santé des enfants à 6 ans. Ces travaux de thèse contribuent à l'évaluation globale de l'innocuité de la prophylaxie ARV utilisée chez les enfants exposés non infectés mais sont également d'intérêt pour ceux qui sont infectés et dont le traitement de première intention intègre le LPV/r et/ou le 3TC.

Mots clés : VIH, prophylaxie, allaitement, enfants exposés non infectés, Afrique Sub-Saharienne, lopinavir/ritonavir, lamivudine, ADN mitochondrial, télomères.

Abstract

The universalization of antiretroviral (ARV) treatment coupled with increased ARV coverage among HIV-infected pregnant and lactating women is contributing to an emerging population of uninfected children born to HIV-positive mothers, exposed to both maternal HIV and ARVs from conception to early childhood. If the impacts of these exposures on the health of these children is questionable and the subject of many studies, the post-natal ARV prophylaxis given to them as part of the prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) of HIV also needs to be rigorously evaluated, as these ARVs continue to be given to uninfected children. In this context, this thesis work consisted of evaluating the acute and long-term genomic toxicity of lopinavir/ritonavir (LPV/r) or lamivudine (3TC) used as infant prophylaxis for one year to prevent MTCT of HIV through breastfeeding in the PROMISE PEP trial conducted in four sub-Saharan African countries (South Africa, Burkina Faso, Uganda and Zambia) between November 2009 and May 2012. While this extended prophylaxis during the entire breastfeeding period has shown its efficacy, with transmission rates at one year of life of 1.4% and 1.5% for LPV/r and 3TC respectively, current World Health Organization guidelines recommend prophylaxis with nevirapine (NVP) or zidovudine combined with NVP for a maximum of 12 weeks. Our work indicates that both prophylaxis regimens were associated with a significant prevalence of mitochondrial DNA depletion (decrease of mitochondrial copy number greater than or equal to 50% of the initial value) in the first year of life in children who are HIV-exposed uninfected. Our work also demonstrated the presence of deleted mitochondrial DNA in almost all children from the initiation of prophylaxis, thus indicating strong genomic instability. However, we found no association with the growth and neuropsychomotor development of these children at 6 years, at which point the depletion no longer persists and the deletions are irreversible. The shortening of telomere length observed at one year of age showed no association with the two ARVs and had no impact on the health of the children at 6 years. This thesis work contributes to the overall evaluation of the safety of ARV prophylaxis used in children who are HIV-exposed uninfected, but is also of interest to those who are infected and whose first-line treatment includes LPV/r and/or 3TC.

Keywords: HIV, prophylaxis, breastfeeding, HIV-exposed uninfected children, Sub-Saharan Africa, lopinavir/ritonavir, lamivudine, mitochondrial DNA, telomeres.

Remerciements

Je remercie l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) de m'avoir permis de réaliser trois années de thèse grâce à la bourse doctorale dont j'ai bénéficiée. Je remercie l'INSERM d'avoir pris le relais pour une année supplémentaire. Enfin, je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Industrie pour m'avoir permis de finir sereinement ce manuscrit de thèse à la suite de la pandémie de la COVID-19 en m'accordant à une prolongation de 3 mois.

Je remercie les mères et les enfants des essais PROMISE PEP/PROMISE M&S ainsi que toutes les équipes présentes sur les quatre sites.

J'adresse également mes remerciements à Madame Josiane WARSZAWSKI et Madame Julie STEFFANN pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit ainsi qu'à Madame Mireille LAFORGE, à Monsieur Pascal REYNIER et à Monsieur Philippe VAN DE PERRE d'en avoir été les examinateurs.

Je tiens à remercier tout particulièrement le directeur de l'unité 1058, Monsieur Philippe VAN DE PERRE. Philippe, merci de m'avoir accordé votre confiance dès notre premier entretien alors que j'étais désespérément à la recherche d'une thèse et sur le point d'abandonner. Merci, de m'avoir offert la possibilité d'intégrer cette magnifique unité en tant que moniteur d'étude biologique puis en tant que doctorante.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse, Monsieur Jean-Pierre MOLES. J'ai la chance d'avoir croisé ton chemin lors de cet oral de Master 2, sans le savoir. Merci pour tout ce que tu m'as appris, merci de m'avoir endurcie, merci de m'avoir fait réfléchir autrement. J'espère que j'aurais marqué ces 5 ans et demi passés à tes côtés, en tout cas, j'ai tout fait pour ! N'oublie pas « Lilou » !

Merci à mes Amies thésardes sans qui le bureau étudiants serait bien triste (et bien moche !). Merci pour votre bonne humeur communicative. Merci pour votre présence et pour votre oreille attentive dans les moments difficiles. Marion, tu l'as écrit toi-même, une fin de thèse à deux c'est mieux ! Ta force mentale ne peut que me laisser admirative. BDQ, tes 10 collations par jour ainsi que ta capacité à faire mourir les cactus (ou à les maltraiter !) ont ponctué ma thèse de bien des rires ! Mélusine, toujours attentionnée. Merci pour toutes les tablettes de chocolat sorties du tiroir lors des petits coups de mou ! Merci à ton plaid du Népal qui m'a réchauffé en bien des occasions ! Constance, la sagesse incarnée ; merci pour toutes les citations surprises que l'on découvre régulièrement au détour d'un bonbon ou d'un chocolat et qui donne le sourire pour la journée (mais quand est-ce que tu prends le temps de trouver tout ça ?!). Orianne, merci pour toutes tes préparations culinaires sucrées !

Une attention particulière pour Charline LE GOFF et Amélie VIZENEUX, qui se sont impliquées corps et âme dans cette thèse. Charline, même si ta présence a été de courte durée, tu t'es impliquée avec toute l'énergie et la rigueur que je n'aurais pu espérer ! Merci pour le dynamisme indéfectible dont tu as fait preuve tout au long des expériences. Cela a été un réel plaisir de t'encadrer pendant ces deux mois. Amélie, je ne saurais comment te témoigner ma reconnaissance pour ton investissement dans la deuxième partie de ma thèse, lorsque j'étais en congé maternité. La PCR télomère ne serait pas ce qu'elle est sans toi. Ton travail remarquable me permet aujourd'hui de raconter une belle histoire alliant mitochondries et télomères. Tu t'es toujours montrée volontaire et disponible à mon retour pour répondre à toutes mes questions. A toutes les deux : un grand merci pour votre contribution sans faille.

Je ne saurais comment exprimer ma gratitude envers les merveilleuses biostatisticiennes avec lesquelles j'ai eu la chance et le plaisir de travailler. Marianne, plus qu'un mentor, une amie ; ta pédagogie m'a fait aimer les statistiques alors que j'en étais complètement hermétique au début de ma thèse ! Merci pour ta patience dans l'apprentissage de la programmation SAS.

Merci également à Roselyne et Sabrina qui ont toujours pris le temps de répondre à mes questions (parfois, souvent ? inutiles ! et quelques fois dans le rush !), malgré leurs emplois du temps bien chargés. Je ne saurais dire le nombre de fois où je suis entrée dans votre bureau presque en criant « Roselyne !! Sabrina !!, j'ai une petite question ... » mais aussi « Je peux vous piquer du chocolat ? ». Merci pour toutes ces fois où vous m'avez aidé à résoudre les messages d'erreurs incompréhensibles de SAS, à démêler les nœuds de mon cerveau, à chercher des solutions pour que mes modèles convergent ! Cette thèse repose sur tout ce que vous m'avez enseigné. Un grand MERCI à vous trois. Merci également à Nicolas NAGOT. Ta rigueur et tes précieux conseils m'ont permis d'améliorer mes analyses statistiques au fil des manuscrits ! Grâce à toi, j'ai pu acquérir les notions fondamentales d'épidémiologie et d'essais cliniques mais aussi prendre du recul et me poser les bonnes questions sur mes analyses.

J'adresse également mes remerciements à tous les autres membres de l'unité 1058, en particulier Chantal, Ségolène, Yannick, Sara, John, Anne-So, Karine, Amandine P., Amandine C., Anaïs, Catherine. A Morgana : merci pour toutes les relectures d'anglais ! A Pierre D. : merci pour ta bienveillance, tes réflexions statistiques et tes discussions, parfois longues, mais tellement intéressantes. Merci également à Valérie DESQUIRET et à Pascal REYNIER de nous avoir fait bénéficier de leur expertise dans le séquençage de l'ADN mitochondrial.

Merci à nos deux gestionnaires administratives, Vanessa et Marion, qui effectuent un travail remarquable au sein de cette unité de recherche. Vanessa, merci de t'être battue (il n'y a pas d'autres mots) à maintes reprises avec Jean-Pierre afin de trouver des solutions pour mes différentes prolongations !

Merci également à tous ceux qui sont passés par le bureau étudiants et qui ont contribué à la bonne humeur et à la convivialité, en particulier Solène, Chloé, Medhi, Jacqueline et Jason.

Une pensée particulière pour ma Louloute. Il est rare de garder ses amis de fac auprès de soi après 10 ou 11 ans. J'espère que nous continuerons encore pendant de nombreuses années à être ces deux étudiantes attendant sous la pluie notre TP de microbiologie. Merci d'avoir toujours été présente pour moi et de m'avoir encouragée et motivée tout au long de cette thèse. Merci pour ton amitié inébranlable.

Un grand merci également à tous les voisins du quartier F.V., les résidents et les expatriés, les grands et les petits. Plus que des voisins, des amis. Sandra, grâce à toi cette thèse bénéficie d'une magnifique table des matières et d'une mise en page aux petits oignons, merci pour toutes les heures passées dessus, merci de m'avoir encouragée dans la dernière ligne droite, MERCI tout simplement ! Merci les voisins pour votre soutien dans tous mes « ras le bol », merci pour votre bonne humeur, vos délires, votre aide et, bon d'accord, pour vos apéros aussi ! D'ailleurs, on attaque à quelle heure ?

Petite dédicace à trois fabuleuses « snippeuses » des fautes d'orthographe : Elisabeth, Joëlle et Marie. Un grand merci d'avoir lu cette thèse en un temps record !

Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes études et qui m'ont donné le goût pour la Science, en commençant par la SVT. Merci à Tonton Yves : loin sur ton île, tu as toujours eu une pensée pour nous en France et tu as toujours été à l'écoute. Merci pour tous tes encouragements dans les dernières étapes de ma thèse.

Merci à ma belle-famille : Nany, Sacha, Tess, Mathilde et piti Gaya. Merci à mes beaux-parents pour leur bienveillance, leur soutien, leurs encouragements, leur disponibilité et pour leur amour tout simplement.

Mon Amour, merci pour tous tes « Je crois en toi » en réponse à mes « Je ne vais pas y arriver ».
Merci pour ton soutien constant et infaillible. Merci de m'avoir supportée quand je n'étais pas dans mes meilleurs jours (il se pourrait bien que j'aie été un peu casse-pied par moment ... !).
A ma Fille qui, à 4 ans, a déjà écrit deux thèses, et à mes deux Fils qui ne savent pas encore ce qu'est une thèse : vos sourires, vos câlins, vos bisous, vos bêtises (il faut bien le dire, vous êtes sacrément inventifs tous les trois), votre humour, votre amour m'ont donné la force de ne rien lâcher dans les moments les plus difficiles et dans les périodes de doute. A toute ma petite (grande) Famille : je vous aime.

A mamie Carmen,

A ma Famille,

*[Quand je ferme les yeux, je peux imaginer
l'invisible.]*

L.

Liste des abréviations et des acronymes

Numérique

3TC : lamivudine

A

ABC : abacavir

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADNn : ADN nucléaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messagers

ARNr : ARN ribosomiques

ARNt : ARN de transfert

ARV : antirétroviraux

ATP : adénosine triphosphate

AZT : azidothymidine

B

bNAbs : *broadly neutralizing antibodies*, anticorps neutralisant à large spectre

C

cART : combinaison antirétrovirale

CBMC : *cord blood mononuclear cells*, cellules mononuclées du sang de cordon

CHEU : *children who are HIV-exposed uninfected*, enfants exposés au VIH non infectés

CHUU : *children who are HIV-unexposed uninfected*, enfants non exposés au VIH non infectés

CRM : chaîne respiratoire mitochondriale

CRS : *Cambridge Reference Sequence*

D

d4T : stavudine

DBS : *dried blood spots*, sang séché sur papier buvard

ddI : didanosine

E

EFV : efavirenz

ERO : espèces réactives à l'oxygène

F

FTC : emtricitabine

H

hTERC : *human telomerase RNA component*, composant ARN de la télomérase humaine

hTERT : *human telomerase reverse transcriptase*, transcriptase inverse de la télomérase humaine

I

INNTI : inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

INTI : inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

IP : inhibiteurs de la protéase

L

LPV/r : lopinavir/ritonavir

M

mt-MRCA : *matrilineal most recent common ancestor*, plus récent ancêtre matrilinéaire commun

N

ND : non disponible

NFV : nelfinavir

NVP : névirapine

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONUSIDA/UNAIDS : Programme commun des Nations-Unies sur le VIH/SIDA

P

PBMC : *peripheral blood mononuclear cells*, cellules mononuclées du sang périphérique

PCR : *Polymerase Chain Reaction*, réaction de polymérisation en chaîne

PEPFAR : *President's Emergency Plan for AIDS Relief*, Plan d'urgence du Président des Etats-Unis pour la lutte contre le SIDA

PLWH : *people living with HIV*, personnes vivant avec le VIH

PTME : prévention de la transmission mère-enfant

S

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience acquise

T

TAR : traitement antirétroviral

Tat : *trans activator of transcription*

TDF : ténofovir di-isopropylfumarate

TERC : telomerase RNA component

TERT : telomerase reverse transcriptase

TFV : ténofovir

TME : transmission mère-enfant

V

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Vpr : *viral protein r*

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	4
Remerciements	5
Liste des abréviations et des acronymes.....	14
Liste des Figures	20
Liste des Tables.....	22
Liste des productions scientifiques	24
Etat de l'art.....	27
Chapitre 1 : L'épidémie pédiatrique à VIH	28
I. Généralités	29
1. Epidémiologie	29
2. Transmission de la mère à l'enfant du VIH.....	30
2.1. Modes et taux de transmission mère-enfant du VIH	30
2.1.1. Bref aperçu historique.....	31
2.1.2. Transmission périnatale du VIH.....	31
2.1.3. Transmission du VIH par l'allaitement	32
2.2. Facteurs de risque	33
2.2.1. Pendant la période périnatale.....	33
2.2.2. Pendant l'allaitement	34
II. Prévention de la transmission mère-enfant (PTME) du VIH	36
1. Politiques mondiales de PTME : passé et présent.....	36
2. Stratégies de PTME.....	38
2.1. Evolution des stratégies de PTME : schémas thérapeutiques et interventionnels.....	38
2.2. Limitations des politiques de PTME et perspectives futures	45
2.2.1. Limitations des politiques de PTME	45
2.2.2. Perspectives futures	48
Chapitre 2 : Emergence d'une nouvelle population : les enfants exposés au VIH et non infectés.....	50
I. Epidémiologie.....	51
II. Santé des enfants exposés au VIH non infectés.....	51
1. Pourquoi s'intéresser à la santé des enfants exposés au VIH non infectés ?	51
2. Santé des enfants exposés au VIH non infectés.....	52

Chapitre 3 : Toxicité génomique des traitements antirétroviraux.....	55
I. Toxicité mitochondriale des antirétroviraux.....	56
1. Généralités sur les mitochondries.....	56
1.1. Origine et structure des mitochondries	56
1.2. Fonctions des mitochondries	57
1.3. Génétique mitochondriale	59
1.3.1. Localisation et structure de l'ADN mitochondrial	59
1.3.2. Mutations de l'ADN mitochondrial et haplogroupes mitochondriaux.....	61
1.4. Maladies mitochondriales	63
2. Mitochondries dans le contexte VIH	65
2.1. Toxicité mitochondriale chez les personnes vivant avec le VIH.....	65
2.2. Mécanisme de la toxicité mitochondriale liée à l'utilisation des antirétroviraux.....	65
2.3. Toxicité mitochondriale chez les enfants exposés au VIH non infectés.....	67
II. Toxicité génomique des antirétroviraux : impact sur la longueur des télomères	74
1. Généralités sur les télomères.....	74
1.1. Historique, structure et fonction.....	74
1.2. Raccourcissement des télomères.....	77
1.2.1. Le problème de fin de réplication des chromosomes	77
1.2.2. Télomérase	79
1.2.3. Cinétique d'attrition des télomères	80
1.2.4. Conséquences du raccourcissement télomérique	81
1.2.5. Facteurs influençant la taille des télomères	81
2. Télomères dans le contexte VIH.....	83
2.1. Longueur des télomères et télomérase chez les personnes vivant avec le VIH	83
2.2. Effet des antirétroviraux sur les télomères et la télomérase.....	84
2.3. Longueur des télomères chez les enfants exposés au VIH non infectés.....	85
III. Interconnexions entre mitochondries, télomérase et télomères.....	89
Objectifs de la thèse.....	91
Résultats.....	95
Article 1 - « <i>Mitochondrial DNA parameters in blood of infants receiving lopinavir/ritonavir or lamivudine prophylaxis to prevent breastfeeding transmission of HIV-1</i> »	97
Article 2 - « <i>Health outcomes at school age among children who are HIV-exposed but uninfected with detected mitochondrial DNA depletion at one year</i> ».....	120
Article 3 - « <i>Longitudinal follow-up of blood telomere length in children who are HIV-exposed uninfected receiving one-year of lopinavir/ritonavir or lamivudine as prophylaxis</i> ».....	136

Discussion et perspectives	162
I. Synthèse des principaux résultats	164
II. Discussion générale et perspectives	165
1. Toxicité mitochondriale : effet du LPV/r	165
2. Effet du genre	167
3. Effet du site.....	168
4. Implication des altérations génomiques dans la santé des enfants exposés non infectés.....	169
4.1. Déplétion et délétion de l'ADNmt	169
4.2. Raccourcissement de la longueur des télomères.....	171
5. Limitations de nos travaux	172
6. Implication de nos travaux en Santé publique	173
Conclusion	176
Bibliographie.....	180
Annexes	212
Article 1 - <i>Supplementary Materials</i>	214
Article 2 - <i>Supplementary Materials</i>	225
Article 3 - <i>Supplementary Materials</i>	233

Liste des Figures

Chapitre 1

Figure 1.1. Estimation du nombre d'adultes et d'enfants infectés par le VIH en 2019	29
Figure 1.2. Estimation du nombre d'enfants de moins de 15 ans infectés par le VIH en 2019 ...	30
Figure 1.3. Transmission du VIH d'une mère infectée à son enfant et risques associés.....	32
Figure 1.4. Evolution du nombre de nouvelles infections parmi les enfants de moins de 15 ans depuis 2000 et politiques mondiales de PTME.....	37
Figure 1.5. Taux de transmission mère-enfant du VIH dans les 21 pays prioritaires d'Afrique Sub-Saharienne en 2019	47
Figure 1.6. Intégration de stratégies préventives complémentaires à l'option B+ pour prévenir la transmission mère-enfant du VIH	49

Chapitre 2

Figure 2.1. Nombre de nouvelles infections à VIH parmi les enfants de moins de 15 ans et nombre d'enfants exposés non infectés sur la période 2011-2019	50
Figure 2.2. Estimation du nombre d'enfants exposés au VIH et non infectés en 2019	51

Chapitre 3

Figure 3.1. Structure d'une mitochondrie	57
Figure 3.2. Complexes mitochondriaux participant aux phosphorylations oxydatives au sein de la membrane interne mitochondriale.....	58
Figure 3.3. Organisation génétique de l'ADN mitochondrial humain	60
Figure 3.4. Haplogroupes mitochondriaux.....	62
Figure 3.5. Panel des principaux symptômes cliniques observés dans les pathologies mitochondriales	63
Figure 3.6. Mécanismes des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) dans la génération de la toxicité mitochondriale	66
Figure 3.7. Organisation architecturale d'un chromosome et structure de l'ADN télomérique ..	75
Figure 3.8. Conformations en T-loop et G-quadruplex des télomères	77
Figure 3.9. Problème de fin de réplication des chromosomes chez les Eucaryotes	78
Figure 3.10. Extension de l'extrémité télomérique 3'G-overhang par la télomérase	79
Figure 3.11. Interconnexions entre dysfonction mitochondriale et raccourcissement des télomères	90

Liste des Tables

Chapitre 1

Table 1.1. Facteurs de risque potentiels associés à la transmission mère-enfant du VIH pendant la période périnatale et l'allaitement 35

Table 1.2. Cascade 90/90/90 associée à la PTME en 2018 pour les 21 pays prioritaires d'Afrique Sub-Saharienne définis d'après le Plan mondial de l'OMS 46

Chapitre 2

Table 2.1. Aperçu des problèmes de santé observés chez les enfants exposés au VIH non infectés 54

Chapitre 3

Table 3.1 Revue de la littérature relative la quantité d'ADNmt rapportée entre les CHEU et les CHUU 72

Table 3.2. Facteurs accélérant le raccourcissement des télomères 82

Table 3.3. Effets des antirétroviraux sur l'activité transcriptase inverse de la télomérase et sur la longueur des télomères *in vitro* 84

Table 3.4. Revue de la littérature relative à la longueur des télomères observée entre les CHEU et les CHUU 88

Liste des productions scientifiques

Articles scientifiques

- **Audrey Monnin**, Nicolas Nagot, Marianne Peries, Roselyne Vallo, Nicolas Meda, Mandisa Singata-Madliki, James K. Tumwine, Chipepo Kankasa, Nobubelo Ngandu, Ameena Goga, Pascal Reynier, Thorkild Tylleskär, Philippe Van de Perre and Jean-Pierre Molès. **Mitochondrial DNA parameters in blood of infant receiving lopinavir/ritonavir or lamivudine prophylaxis to prevent breastfeeding transmission of HIV-1.** *Journal of Clinical Medicine* 2020, 9, 2972.

- **Audrey Monnin**, Nicolas Nagot, Sabrina Eymard-Duvernay, Nicolas Meda, James K. Tumwine, Thorkild Tylleskär, Philippe Van de Perre and Jean-Pierre Molès, for the PROMISE consortium. **Health outcomes at school age among children who are HIV-exposed but uninfected with detected mitochondrial DNA depletion.** *Journal of Clinical Medicine* 2020, 9, 3680.

- **Audrey Monnin**, Amélie Vizeneuve, Nicolas Nagot, Sabrina Eymard-Duvernay, Nicolas Meda, Mandisa Singata-Madliki, James K. Tumwine, Chipepo Kankasa, Nobubelo Ngandu, Ameena Goga, Thorkild Tylleskär, Philippe Van de Perre and Jean-Pierre Molès. **Longitudinal follow-up of blood telomere length in children who are HIV-exposed uninfected receiving one-year of lopinavir/ritonavir or lamivudine as prophylaxis** (en soumission dans *Frontiers in Medicine*).

Communications dans des colloques scientifiques

Présentations orales

- **Conference on Retroviruses and Opportunistic infections (CROI)**, 4-7 mars 2018, Boston, Massachusetts, Etats-Unis. **Themed discussion** : “HIV-exposed children: How are they different?” <http://www.croiwebcasts.org/console/player/37114?mediaType=slideVideo&>.

- Séminaire Club métabolisme ; 6 février 2020, Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy (IRMB) Hôpital Saint-Eloi, Montpellier. Mitochondrial DNA defects in HIV-exposed uninfected children receiving prophylaxis.

Posters

- **Audrey Monnin**, Nicolas Nagot, Marianne Peries, Roselyne Vallo, Nicolas Meda, Mandisa Singata, James Tumwine, Pascal Reynier, Thorkild Tylleskär, Philippe Van de Perre, Jean-Pierre Molès. **Lopinavir/ritonavir induces mitochondrial toxicity in HIV-exposed uninfected children.** *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI)*, 4-7 mars 2018, Boston, Massachusetts, Etats-Unis. Poster 878. <https://www.croiconference.org/abstract/lopinavirritonavir-induces-mitochondrial-toxicity-hiv-exposed-uninfected-children-0/>.

- **Audrey Monnin**, Nicolas Nagot, Marianne Peries, Roselyne Vallo, Nicolas Méda, Justus Hofmyer, James Tumwine, Thorkild Tylleskär, Philippe Van de Perre et Jean-Pierre Molès, pour le consortium PROMISE ANRS 12174. **Prévention de la transmission du VIH-1 par l'allaitement : quelles toxicités mitochondriales des traitements antirétroviraux administrés en prophylaxie ?** Sixième édition de l'*Université des Jeunes Chercheurs Sidaction*, 14-20 octobre 2017, Carry-le-Rouet, France.

Etat de l'art

Chapitre 1 : L'épidémie pédiatrique à VIH

I. Généralités

1. Epidémiologie

En 2019, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), agent étiologique du Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA), était responsable de près de 38 millions d'infections à travers le monde (**Figure 1.1**)¹. Le continent africain, et plus particulièrement l'Afrique Sub-Saharienne (regroupant Afrique de l'Ouest, Afrique Centrale, Afrique de l'Est et Afrique du Sud), concentre les deux tiers de la population mondiale vivant avec le VIH².

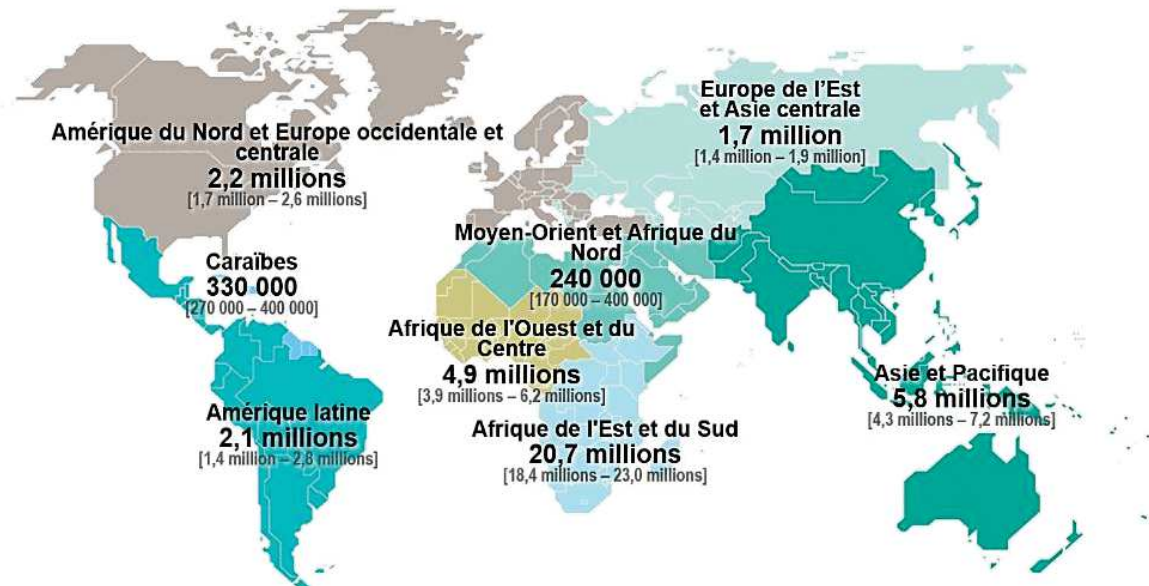


Figure 1.1. Estimation du nombre d'adultes et d'enfants infectés par le VIH en 2019.

Source : ONUSIDA juillet 2020, Diapositives clés sur les données épidémiologiques².

La pandémie pédiatrique persiste avec 1 800 000 enfants de moins de 15 ans vivant avec le VIH recensés en 2019 (**Figure 1.2**)¹. Celle-ci demeure encore aujourd’hui une préoccupation de santé publique majeure en Afrique Sub-Saharienne qui regroupe près de 65% des cas. C’est d’ailleurs dans cette région du monde que 90% des 150 000 nouvelles infections infantiles ont été enregistrées cette même année.

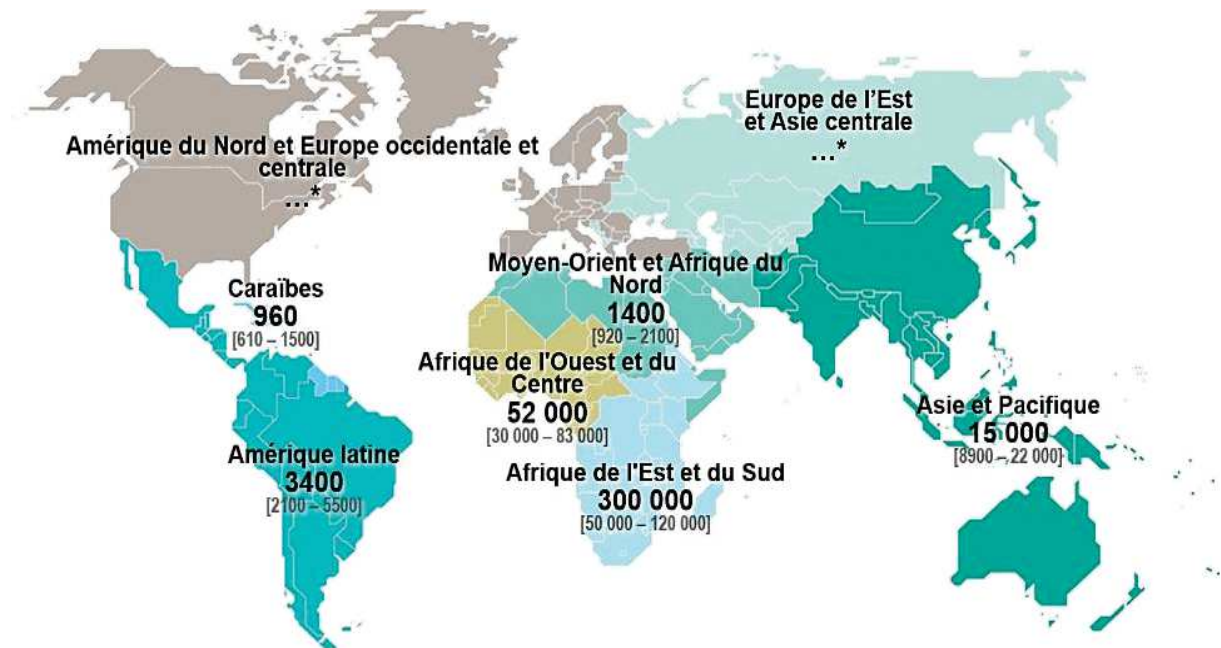


Figure 1.2. Estimation du nombre d’enfants de moins de 15 ans infectés par le VIH en 2019. *Les estimations du nombre d’enfants ne sont pas publiées en raison des chiffres réduits. Source : ONUSIDA juillet 2020, Diapositives clés sur les données épidémiologiques².

2. Transmission de la mère à l’enfant du VIH

2.1. Modes et taux de transmission mère-enfant du VIH

La majorité des infections infantiles à VIH est imputable à la transmission de la mère à l’enfant (TME) du virus. Cette TME peut survenir au cours de trois phases clés : pendant la grossesse, pendant le travail et l’accouchement et pendant l’allaitement (**Figure 1.3**). En 2019, le Programme commun des Nations Unies sur le VIH/sida (ONUSIDA) estimait le taux de TME à 11,3%¹.

2.1.1. Bref aperçu historique

La transmission périnatale du VIH est connue de longue date. Jusqu'au début des années 90, les études portant sur la TME du virus rapportaient des infections survenant au cours de la grossesse, pendant le travail et pendant l'accouchement. Il est important de mentionner que le diagnostic sérologique de la maladie chez les enfants de moins de 18 mois est rendu impossible d'une part par la présence d'anticorps maternels transmis passivement à l'enfant, ne permettant ainsi pas la discrimination entre les anticorps anti-VIH maternels de ceux potentiellement produits par l'enfant suite à sa séroconversion, et d'autre part par la présence d'une « fenêtre sérologique » au cours de laquelle les anticorps anti-VIH ne sont pas produits en quantité suffisante pour être détectés. La discrimination des transmissions survenant tardivement au cours de cette période périnatale de celles pouvant survenir pendant la période post-natale, c'est-à-dire via l'allaitement, par diagnostic moléculaire était également rendue difficile par la sensibilité limitée des techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) employées pour quantifier la charge virale dans les cellules sanguines des nouveau-nés âgés de moins de 2 mois. Cependant, en 1985, une équipe Australienne rapporte pour la première fois un cas probable de TME via l'allaitement³. Cette découverte suscita davantage de recherche sur la transmission postnatale du virus, si bien qu'en 1992, 15 études rapportant 24 cas plausibles de TME par le lait maternel sont venues la corroborer⁴. Si la plupart des infections infantiles de ces études faisaient suite à une séroconversion maternelle après l'accouchement suite à une transfusion sanguine avec du sang contaminé⁴, trois d'entre elles ont néanmoins rapporté l'implication d'une séroconversion maternelle suite à une transmission sexuelle du virus via un partenaire contaminé⁵⁻⁷.

2.1.2. Transmission périnatale du VIH

La transmission périnatale du VIH survient pour un tiers des cas au troisième trimestre de la grossesse, majoritairement quelques semaines avant l'accouchement⁸⁻¹⁵. Les transmissions précoces au cours du premier et deuxième trimestre sont très peu fréquentes^{8,11}. Le placenta joue un rôle majeur dans ce contexte, assurant moins bien sa fonction de barrière protectrice en fin de grossesse. Le travail et l'accouchement contribuent quant à eux pour deux tiers des transmissions en raison d'un accroissement des contacts du bébé avec les liquides biologiques de la mère (sang et sécrétions vaginales), incluant leur ingestion par l'enfant⁸⁻¹⁵. En absence de traitement antirétroviral (TAR) ou prophylactique chez la femme enceinte et/ou le nouveau-né, le taux de TME attribuable à la grossesse, au travail et à l'accouchement varie de 15 à 30%¹⁴.

2.1.3. Transmission du VIH par l'allaitement

Il est aujourd'hui établi que le lait maternel constitue un réservoir de VIH et joue un rôle majeur dans l'apparition des nouvelles infections infantiles associées¹⁶. La présence de virus libres (détection de particules virales ou d'acides ribonucléiques (ARN) libres)¹⁷⁻²⁰ et de cellules infectées (détection d'acides désoxyribonucléiques (ADN) proviral dans les cellules) dans le lait semblent associée à cette transmission²¹⁻²³, bien que la part de contribution de chacun reste encore à élucider^{24,25}.

L'allaitement maternel accroît le risque de TME d'environ 14%^{14,26}. On estime ainsi que le taux global de TME (incluant la période périnatale) dans les populations allaitantes varie de 30 à 45%²⁷. Si les transmissions par le lait maternel peuvent se produire tout au long de l'allaitement, la majorité d'entre elles adviennent cependant au cours des six premiers mois^{4,27,28}. Par ailleurs en présence d'une charge virale maternelle indétectable, il existe un taux résiduel de transmission cumulatif par mois d'allaitement estimé à 0.2%²⁹.

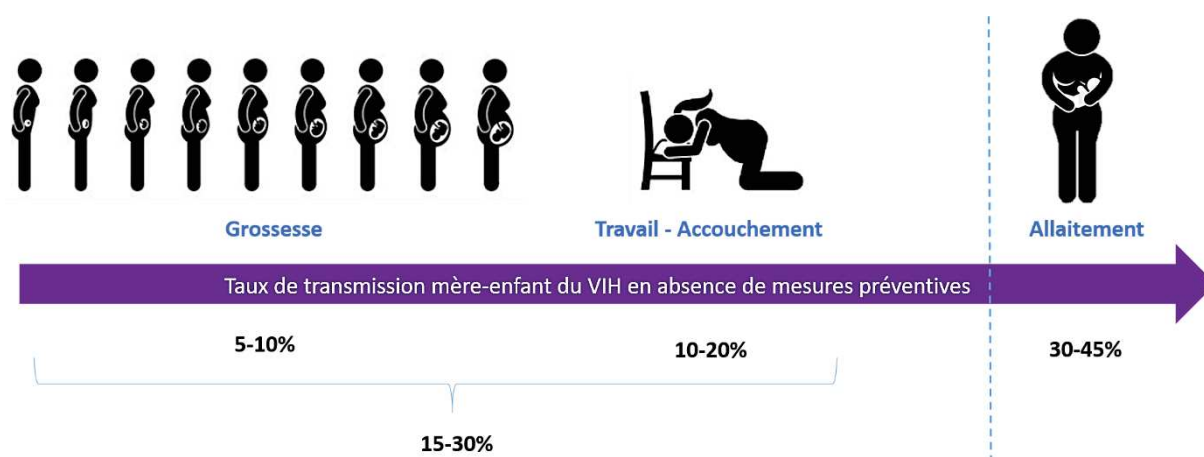


Figure 1.3. Transmission du VIH d'une mère infectée à son enfant et risques associés. La transmission materno-fœtale du virus peut survenir pendant la grossesse, pendant le travail et l'accouchement et pendant l'allaitement, avec des taux de transmission variables. Source : d'après De Cock et al., 2000¹⁴.

2.2. Facteurs de risque

2.2.1. Pendant la période périnatale

De nombreux facteurs de risque peuvent accroître le taux de TME du VIH pendant la grossesse, le travail et l'accouchement et peuvent être d'origines multiples. Il est important de préciser que la plupart de ces facteurs ont été essentiellement documentés avant la mise en place de multi-thérapies antirétrovirales chez la femme enceinte.

Plusieurs déterminants liés à l'infection maternelle elle-même entrent en jeu. Une charge virale plasmatique élevée, notamment suite à une séroconversion pendant la grossesse (phase de primo-infection)³⁰⁻³³ ou à l'arrêt du TAR (effet rebond)³⁴, constitue le risque majeur de transmission du virus³⁵⁻⁴⁶; une augmentation de la charge virale étant associée à une augmentation du risque de transmission. Bien qu'une TME soit peu fréquente en présence d'une faible virémie, elle n'est cependant pas à exclure⁴⁷. Une immunodépression sévère, caractérisée par un nombre de lymphocytes T CD4+ bas et/ou un stade avancé de la maladie (phase SIDA déclaré), contribue également à la transmission virale^{38,41,43,46,48-53}. L'initiation tardive du TAR et l'emploi d'une monothérapie sont autant de facteurs supplémentaires^{45,54-58}. Le type de VIH intervient aussi, le VIH-1 étant associé à une TME plus importante que le VIH-2⁵⁹⁻⁶⁴.

Les infections sexuellement transmissibles (infections à papillomavirus, herpès génital, trichomonase, gonococcie, chlamydie et syphilis)^{38,53,65-73}, ainsi que d'autres co-infections maternelles d'origine virales (hépatite C, infections à Cytomégalovirus)^{72,74}, bactériennes (tuberculose, vaginose)^{38,72,75} ou parasitaires (paludisme, toxoplasmose, trypanosomiase) favorisent la transmission materno-fœtale du VIH^{72,76-79}.

L'utilisation de drogues d'addiction (cocaïne/crack, héroïne, méthadone) pendant la grossesse vient aussi peser sur la balance des risques^{33,50,51,80}.

Par ailleurs, un accouchement prématuré et/ou par voie basse (en comparaison à un accouchement par césarienne électorale pratiquée avant le début du travail et avant la rupture des membranes amniotiques) sont aussi associés à une augmentation du risque de TME^{44-46,48,52,53,66,81-83}.

D'autres facteurs obstétricaux incluant une rupture prématurée des membranes amniotiques^{42,45,50,51,66,84-87}, associée ou non à l'infection de celles-ci (chorioamniotite)^{43,86}, ainsi que certains gestes plus ou moins invasifs pratiqués pendant la grossesse tels que l'amniosynthèse, l'amnioscopie ou le cerclage du col de l'utérus, viennent accroître le risque de transmission⁶⁶. Les grossesses gémellaires sont particulièrement à risque, avec un taux de transmission plus important pour le premier jumeau né⁸⁸.

Des polymorphismes génétiques maternels incluant entre autre des variants dans le promoteur du gène CCR5 (co-récepteur membranaire permettant au VIH d'entrer dans les cellules) ou dans les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité semblent également impliqués dans la TME du virus^{89,90}.

Certains facteurs sont d'autre part liés à l'enfant, notamment si le poids la naissance est inférieur à 2,5 kg^{33,42,45,50-52} et si l'enfant est de sexe féminin^{46,91-93}.

2.2.2. Pendant l'allaitement

Des facteurs de risque supplémentaires viennent se surajouter en cas d'allaitement et peuvent être, là aussi, d'origines multiples. Certains sont communs aux transmissions ayant lieu pendant la période périnatale comme une charge virale plasmatique élevée⁹⁴⁻⁹⁶ ou bien encore le statut immunodéprimé de la mère^{95,97}. Une charge virale élevée dans le lait représente un facteur de risque additionnel^{19,94}. De plus, plus la charge virale plasmatique ou dans le lait est élevée, plus le risque de TME est grand^{19,94}. La TME est aussi facilitée par des co-infections maternelles, notamment par celles à Cytomégalovirus^{98,99}.

D'autre part, l'état des seins représente un facteur de risque non négligeable, la présence de mastites^{94,97}, d'abcès mammaires⁷ ou bien encore de lésions telles que les crevasses facilitant la transmission virale⁹⁷. La présence de plaies buccales ou de candidoses chez l'enfant (muguet) peut venir accroître le risque⁹⁷.

D'autres facteurs liés à l'allaitement au sens propre du terme peuvent être impliqués. C'est notamment le cas du mode d'allaitement. En effet, un allaitement mixte, en comparaison à un allaitement maternel exclusif, est associé à une augmentation du risque de transmission, pouvant aller jusqu'au doublement de celui-ci^{28,100-105}. D'autre part, le risque de TME via l'allaitement est cumulatif^{97,104,106-109}. La composition du lait maternel entre également en jeu.

Une faible concentration en certaines substances à activité antivirale, parmi lesquelles nous pouvons distinguer lactoferrine, lysozyme et inhibiteur de la leucoprotéase^{25,110-114}, ou en anticorps, immunoglobulines A et M^{22,25,115}, semble être associée à une augmentation du risque de transmission.

Les différents facteurs de risque potentiels de la TME du VIH sont résumés dans la **Table 1.1**.

GROSSESSE, TRAVAIL ET ACCOUCHEMENT	ALLAITEMENT
Facteurs maternels	Facteurs maternels
<i>Intrinsèques à l'infection à VIH</i>	<i>Intrinsèques à l'infection à VIH</i>
Charge virale plasmatique élevée Séroconversion pendant la grossesse Arrêt du traitement antirétroviral Immunodépression Initiative tardive du traitement antirétroviral Monothérapie antirétrovirale VIH de type 1	Séroconversion pendant l'allaitement Charge virale élevée dans le lait Immunodépression
<i>Co-infections</i>	<i>Co-infections</i>
Maladies sexuellement transmissibles Infections virales, bactériennes ou parasitaires	Infections à Cytomégalovirus
<i>Autres</i>	<i>Etat des seins</i>
Consommation de drogues d'addiction pendant la grossesse	Mastite Abscesses mammaires Crevasses
Facteurs obstétricaux	Facteurs liés au mode d'alimentation
Accouchement prématuré Accouchement par voie basse Rupture prématurée des membranes amniotiques Chorioamniotite Gestes invasifs pendant la grossesse Grossesses gémellaires et premier jumeau né	Allaitement mixte Allaitement prolongé Faible concentration en molécules à activité antivirale ou en anticorps dans le lait
Facteurs génétiques	Facteurs infantiles
Polymorphismes génétiques	Candidoses (muguet) Plaies buccales
Facteurs infantiles	
Faible poids à la naissance Sexe féminin	

Table 1.1. Facteurs de risque potentiels associés à la transmission mère-enfant du VIH pendant la période périnatale et l'allaitement.

II. Prévention de la transmission mère-enfant (PTME) du VIH

La prévention de la transmission de la mère à l'enfant du VIH (PTME) regroupe un ensemble d'interventions ayant pour finalité de réduire le taux de TME. Elle intègre la prévention de l'infection à VIH chez les femmes en âge de procréer, la prévention des grossesses non désirées chez les femmes vivant avec le VIH et bien évidemment la prévention de la transmission du VIH d'une femme enceinte séropositive à son enfant. Elle inclue également l'accès au dépistage et le recours aux traitements antirétroviraux mais aussi des conseils en pratique d'allaitement et du soutien aux femmes infectées dans la prise de leur traitement.

Si la combinaison de ces mesures préventives a permis de réduire le taux de TME du VIH à moins de 1% dans les pays à fortes ressources comme en Europe ou aux Etats-Unis, elles ne sont cependant pas totalement applicables dans les pays à ressources limitées où d'une part, les conditions sanitaires ne permettent pas de pratiquer des accouchements par césarienne ni de reconstituer du lait artificiel, et d'autre part où l'abandon de l'allaitement n'est tout simplement pas envisageable car il reste le seul moyen de lutter contre la malnutrition et les maladies diarrhéiques et respiratoires, principales causes de mortalité infantile¹¹⁶. C'est pourquoi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise dans ces régions du monde un allaitement maternel pendant la première année de vie de l'enfant, incluant un allaitement exclusif au cours des six premiers mois, pouvant être prolongé jusqu'à l'âge de deux ans ou plus¹¹⁷.

1. Politiques mondiales de PTME : passé et présent

En 2011, ONUSIDA et le Plan d'urgence du Président des Etats-Unis pour la lutte contre le sida (PEPFAR) lancent un Plan mondial d'action ayant pour objectifs : (1) de réduire de 90% le nombre de nouvelles infections infantiles à VIH, avec un abaissement du taux de TME à moins de 5% pour les populations allaitantes et à moins de 2% pour les populations non allaitantes, et (2) de réduire de 50% la mortalité maternelle liée au VIH, à l'horizon 2015¹¹⁸. Ce Plan mondial a été initié dans 21 pays prioritaires d'Afrique Sub-Saharienne, qui regroupaient au total 90% des femmes enceintes infectées par le VIH en 2009¹¹⁹.

Si cette initiative a permis de réduire de façon remarquable le nombre de nouvelles infections à VIH survenant chez les enfants passant de 330 000 cas en 2009 à 170 000 en 2014 (**Figure 1.2**), d'accélérer l'élimination de ces nouvelles infections infantiles en enregistrant une diminution de 48% en 2014 contre 13% entre les années 2000 et 2008, et de réduire de moitié le taux de TME dans les 21 pays prioritaires avec un taux de 14% en 2014, les objectifs fixés n'ont cependant pas été atteints¹¹⁹.

Parallèlement, en 2014, l'ONUSIDA fixe le but ultime de mettre fin à la pandémie de VIH d'ici à 2030, en s'appuyant sur la cascade 90/90/90 : en 2020, 90% des personnes vivant avec le VIH sont dépistées et connaissent leur statut VIH, 90% des personnes infectées dépistées reçoivent un TAR et 90% des personnes recevant un TAR ont une charge virale indétectable¹²⁰.

Afin de poursuivre la dynamique instaurée par le Plan mondial, ONUSIDA et PEPFAR mettent en place en 2016 le programme « Start Free. Stay Free. AIDS Free » et définissent de nouveaux objectifs, bien qu'ambitieux, incluant la réduction du nombre de nouvelles infections infantiles à VIH à moins de 40 000 en 2018 et à moins de 20 000 en 2020¹²¹. A la lumière des dernières données de l'ONUSIDA, cet objectif semble manifestement difficile à atteindre pour 2020 avec encore 150 000 nouvelles infections infantiles recensées en 2019¹ (**Figure 1.2**).

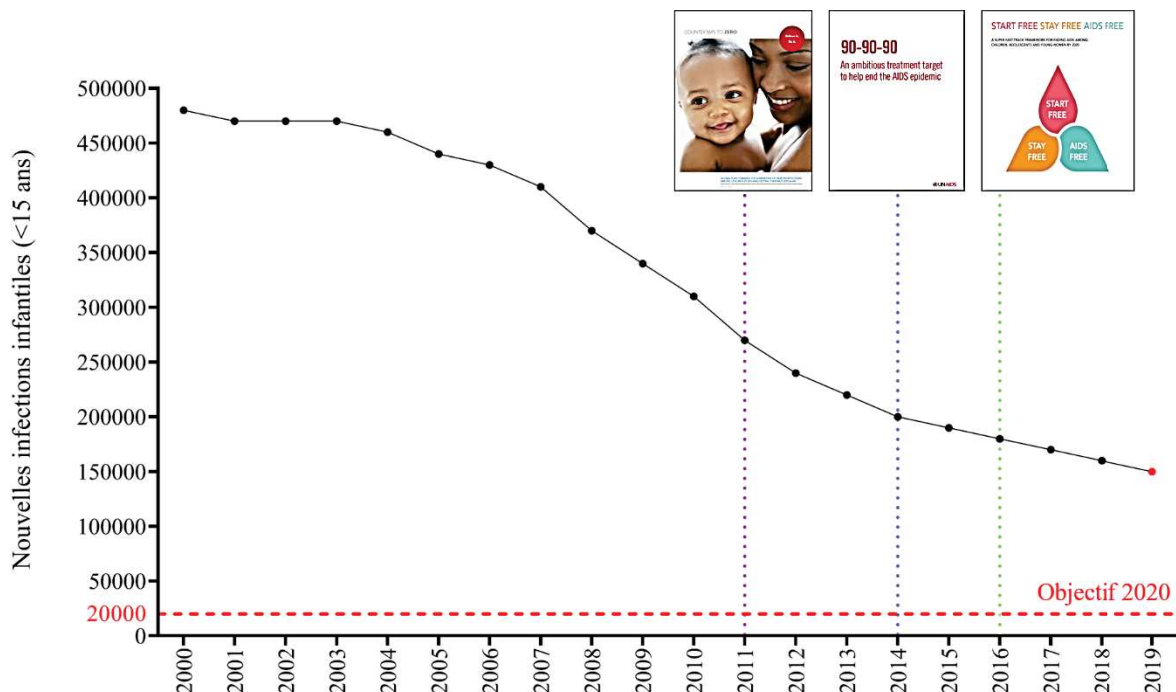


Figure 1.4. Evolution du nombre de nouvelles infections parmi les enfants de moins de 15 ans depuis 2000 et politiques mondiales de PTME. Source : données ONUSIDA de 2000 à 2019¹.

2. Stratégies de PTME

2.1. *Evolution des stratégies de PTME : schémas thérapeutiques et interventionnels*

En premier lieu, il convient de différencier deux notions importantes qui seront employées tout au long de ce manuscrit : « traitement antirétroviral » et « prophylaxie antirétrovirale ». Le terme de « traitement antirétroviral » sera utilisé pour les femmes enceintes infectées par le VIH remplissant les critères d'éligibilité de l'OMS et nécessitant un traitement pour leur propre santé. Le terme de « prophylaxie antirétrovirale » sera utilisé pour les femmes enceintes infectées ne remplissant pas ces critères et ne nécessitant pas de traitement antirétroviral pour leur propre santé. On parlera également de « prophylaxie antirétrovirale » pour les enfants non infectés nés de mères infectées pour prévenir l'acquisition du VIH.

L'année 1994 marque une étape clé dans le cheminement vers l'initiation d'une PTME du VIH avec l'essai PACTG 076 (*Pediatric AIDS Clinical Trials Group 076*) conduit aux Etats-Unis et en France sur 477 participants¹²². Cette étude démontre pour la première fois l'efficacité d'un TAR pendant la grossesse pour prévenir la TME du VIH. L'utilisation de l'azidothymidine (AZT) pendant la grossesse (à raison de 5 fois par jour à partir de la quatorzième semaine de gestation) et le travail mais également chez le nouveau-né pendant les 6 semaines suivant la naissance a permis de réduire d'environ 68% le risque de TME par rapport au groupe placebo. Si ce protocole reste accessible dans les pays à fortes ressources tels que les Etats-Unis où il a d'ailleurs été recommandé la même année par les centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC), la complexité, la durée et le coût du TAR rend difficile son implémentation dans les pays à ressources limitées¹²³. Ce n'est qu'en 1998 que l'OMS recommande un protocole allégé, basé sur l'utilisation de l'AZT débuté tardivement au cours de la grossesse (2 fois par jour à partir de la 36^{ème} semaine de gestation) et pendant le travail suite à un essai clinique Thaïlandais incluant 391 participants et démontrant une réduction de 50% du taux de TME comparé au groupe placebo¹²⁴.

Fortes de ces publications et confortées par d'autres protocoles plus simples et tout aussi efficaces parus au cours des années suivantes, l'OMS publie en octobre 2000 les premières recommandations mondiales portant sur l'utilisation des antirétroviraux (ARV) pour prévenir la TME du VIH¹²⁵.

Celles-ci préconisent au choix trois régimes ARV initiés plus ou moins précocement ou tardivement pendant la grossesse où le travail et couplé ou non à une prophylaxie ARV maternelle et/ou infantile après l'accouchement pour une durée maximale de 7 jours.

En 2004, les recommandations se renforcent par l'ajout de critères d'éligibilité cliniques et immunologiques, basés respectivement sur le stade de l'infection à VIH défini par l'OMS et le nombre de lymphocytes CD4+ présents dans le sang si la numération de ces derniers est disponible¹²⁶. Sont considérées comme éligibles à un traitement ARV les femmes enceintes : (1) en stade 3 et ayant un nombre de CD4+ inférieur à 350 cellules/mm³, (2) en stade 4 sans tenir compte du nombre de CD4+ et, (3) en stade 1 et 2 et ayant un nombre de CD4+ inférieur à 200 cellules/mm³. En cas de non-disponibilité du nombre de CD4+, les critères d'éligibilité sont étendus à toutes les femmes enceintes en stade 3 et 4 et en stade 2 si le nombre de lymphocytes total dans le sang est inférieur à 1200 cellules/mm³. Les traitements ARV consistent en une trithérapie maternelle initiée à partir du deuxième trimestre de la grossesse ou au plus tôt si l'état de santé de la mère l'exige. Les nouveau-nés reçoivent quant à eux, dès la naissance, une prophylaxie ARV en dose unique ou pendant une semaine. En ce qui concerne les femmes enceintes non éligibles à un traitement ARV, l'OMS préconise une prophylaxie débutée au plus tôt à 28 semaines de grossesse et poursuivie pendant le travail, couplée à une prophylaxie ARV chez le nouveau-né pendant une semaine.

A partir de 2006, les critères d'éligibilité de 2004 sont conservés à l'exception de celui portant sur la mise sous traitement ARV des femmes enceintes en stade 2 n'ayant pas une numération des CD4+¹²⁷. La trithérapie ARV maternelle pour les femmes éligibles reste la même et doit être initiée au plus tôt pendant la grossesse. La prophylaxie ARV chez les nouveau-nés est étendue à 7 jours ou à 4 semaines si le traitement ARV maternel a été suivi pendant moins de 4 semaines au cours de la grossesse. Pour les femmes enceintes non éligibles, les prophylaxies ARV maternelles et infantiles sont étendues à 7 jours.

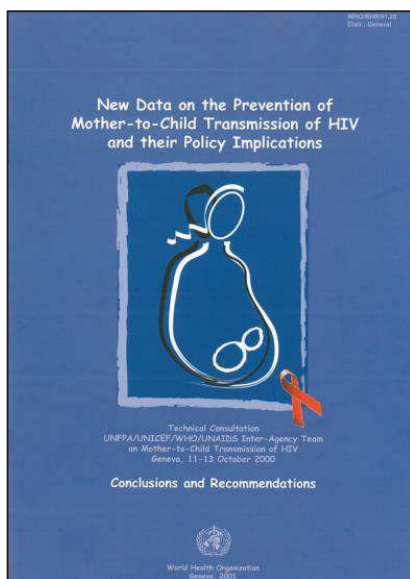
En 2010, les directives mondiales prennent un nouveau tournant et se complexifient par l'apport de recommandations concernant la PTME en cas d'allaitement¹²⁸. Les critères d'éligibilité sont simplifiés et préconisent le plus tôt possible une trithérapie ARV à vie à toutes les femmes enceintes ayant un nombre de CD4+ inférieur à 350 cellules/mm³ sans tenir compte du stade clinique de l'infection à VIH et à toutes les femmes enceintes en stade 3 ou 4 sans tenir compte du nombre de CD4+. Une prophylaxie ARV est également administrée aux nouveau-nés pendant 4 à 6 semaines, qu'ils soient allaités ou non.

En cas de non-éligibilité à un traitement ARV, les programmes nationaux de PTME se voient offrir le choix entre deux options, toutes deux initiées au plus tôt à 14 semaines de grossesse. L'option A prévoit une prophylaxie ARV maternelle pendant la grossesse jusqu'à 7 jours après l'accouchement maximum. Les nouveau-nés allaités reçoivent une prophylaxie ARV jusqu'à une semaine après la fin de l'allaitement ou pendant 4 à 6 semaines le cas échéant. L'option B offre quant à elle une triple prophylaxie ARV maternelle prenant fin après l'accouchement ou une semaine après l'arrêt de l'allaitement, couplée à une prophylaxie de 4 à 6 semaines chez les nouveau-nés allaités ou non.

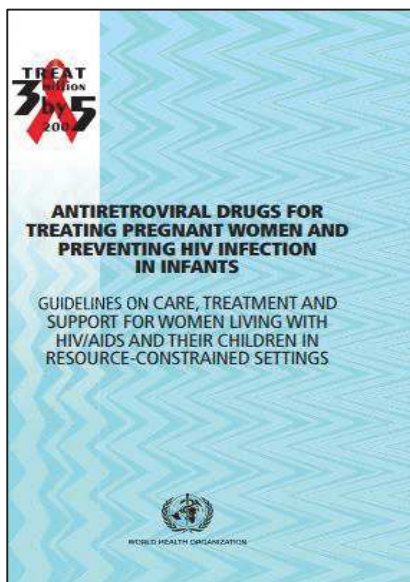
En 2013, l'OMS harmonise les recommandations et préconise un traitement ARV à vie au choix des programmes nationaux, soit pour toutes les femmes enceintes et allaitantes indépendamment de leur stade clinique d'infection à VIH ou de leur nombre de CD4+ (option B+), soit seulement pour celles répondant à de nouveaux critères d'éligibilité qui sont : être en stade 3 ou 4 ou avoir un nombre de CD4 inférieur à 500 cellules/mm³ (option B)¹²⁹. Cette dernière option offre également la possibilité aux femmes non éligibles de recevoir un TAR jusqu'à l'accouchement ou une semaine après la fin de l'allaitement. Une prophylaxie ARV infantile commune aux deux options est recommandée pendant 6 semaines maximum, allaitement ou non.

Enfin, les recommandations de l'OMS de 2016 marquent une universalité des traitements pour toutes les personnes vivant avec le VIH, femmes enceintes et allaitantes incluses, et préconisent une trithérapie ARV à vie quel que soit le stade clinique de l'infection à VIH ou le nombre de CD4+ (option B+)¹³⁰. Les nouveau-nés reçoivent une prophylaxie ARV pendant 12 semaines en cas d'allaitement ou sinon pendant 6 semaines.

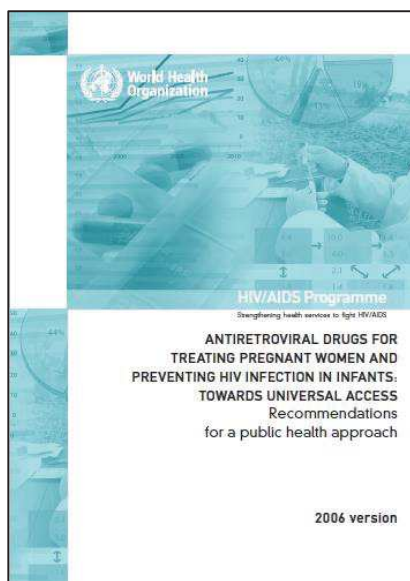
Un détail des différents régimes ARV utilisés en première ligne de traitement pour chaque recommandation est présenté ci-dessous :



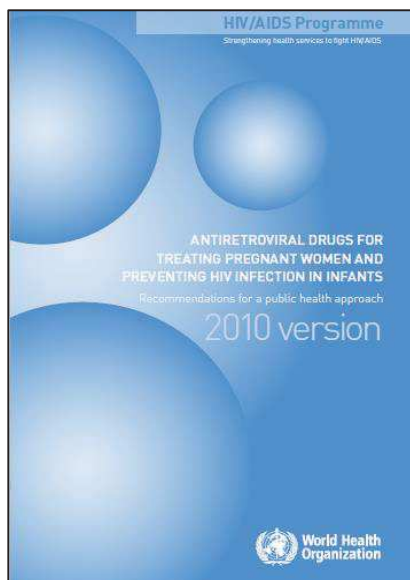
Recommandations de 2000	
<p>Femmes enceintes (au choix)</p> <p>AZT : pendant la grossesse (au plus tôt à 14 semaines), le travail et l'accouchement</p> <p>AZT : pendant la grossesse (au plus tôt à 14 semaines), le travail et jusqu'à une semaine après l'accouchement</p> <p>AZT+3TC : pendant la grossesse (initiation à 36 semaines), le travail et jusqu'à une semaine après l'accouchement</p> <p>AZT+3TC : pendant le travail et jusqu'à une semaine après l'accouchement</p> <p>NVP : uniquement pendant le travail</p>	<p>Nouveau-nés (au choix)</p> <p>AZT : pendant 7 jours</p> <p>AZT : pendant 1 à 6 semaines</p> <p>AZT+3TC pendant 7 jours</p> <p>NVP : pendant 7 jours</p>



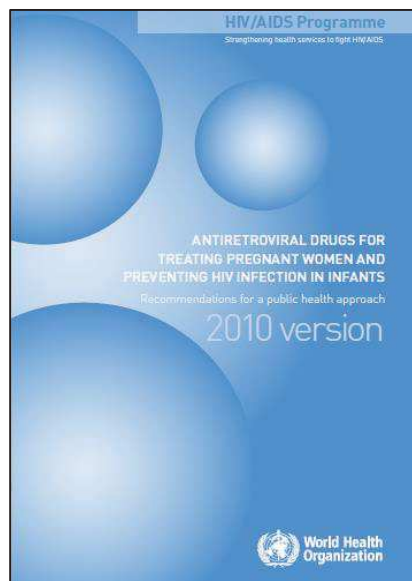
Recommandations de 2004	
Critères d'éligibilité respectés	Critères d'éligibilité non respectés
<p>Femmes enceintes à partir du 2^{ème} trimestre de grossesse :</p> <p>AZT+3TC+NVP ou d4T+3TC+NVP</p> <p>Nouveau-nés (au choix) :</p> <p>AZT : pendant 7 jours</p> <p>NVP : en dose unique</p> <p>NVP en dose unique + AZT pendant 7 jours</p>	<p>Femmes enceintes à partir de la 28^{ème} semaine de grossesse:</p> <p>AZT pendant la grossesse puis NVP en dose unique couplé à l'AZT pendant le travail</p> <p>Nouveau-nés :</p> <p>NVP en dose unique + AZT pendant 7 jours</p>



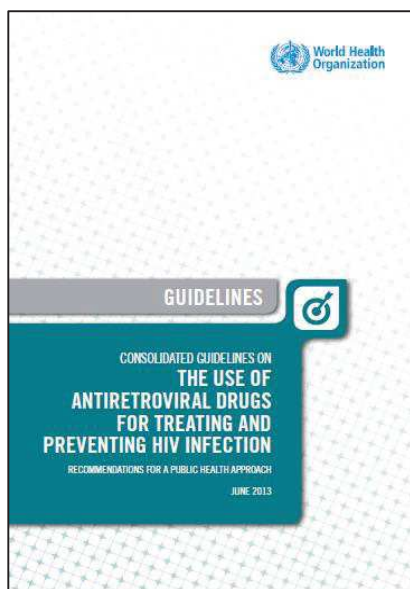
Recommandations de 2006	
Critères d'éligibilité respectés	Critères d'éligibilité non respectés
<p>Femmes enceintes le plus tôt possible pendant la grossesse :</p> <p>AZT+3TC+NVP pendant la grossesse, le travail et l'accouchement.</p> <p>Nouveau-nés :</p> <p>AZT : pendant 7 jours ou 4 semaines si le TAR maternel pendant la grossesse a duré moins de 4 semaines</p>	<p>Femmes enceintes à partir de la 28^{ème} semaine de grossesse:</p> <p>AZT pendant la grossesse puis NVP en dose unique couplé à AZT+3TC pendant le travail puis AZT+3TC pendant 7 jours après l'accouchement</p> <p>Nouveau-nés :</p> <p>NVP en dose unique + AZT pendant 7 jours</p>



Recommandations de 2010	
Critères d'éligibilité respectés	
<p>Femmes enceintes le plus tôt possible pendant la grossesse (au choix) :</p> <p>AZT+3TC+NVP AZT+3TC+EFV TDF+3TC ou (FTC)+NVP TDF+3TC ou (FTC)+EFV</p> <p>Nouveau-nés allaités ou non :</p> <p>NVP ou AZT : pendant 4 à 6 semaines</p>	



Recommandations de 2010 (suite)	
Critères d'éligibilité non respectés : OPTION A	
<p>Femmes enceintes au plus tôt à 14 semaines de grossesse :</p> <p>AZT pendant la grossesse NVP en dose unique couplé à AZT+3TC pendant le travail AZT+3TC pendant 7 jours après l'accouchement</p> <p>(ou AZT jusqu'à l'accouchement si le TAR maternel pendant la grossesse a duré plus de 4 semaines)</p>	<p>Nouveau-nés :</p> <p><u>Allaités :</u></p> <p>NVP pendant minimum 4 à 6 semaines jusqu'à 1 semaine après la fin de l'allaitement</p> <p><u>Non allaités :</u></p> <p>NVP ou AZT pendant 4 à 6 semaines</p>
Recommandations de 2010 (suite)	
Critères d'éligibilité non respectés : OPTION B	
<p>Femmes enceintes au plus tôt à 14 semaines de grossesse (au choix) :</p> <p>AZT+3TC+LPV/r AZT+3TC+ABC AZT+3TC+EFV TDF+3TC (ou FTC)+EFV</p> <p>Jusqu'à l'accouchement ou 1 semaine après la fin de l'allaitement</p>	<p>Nouveau-nés :</p> <p><u>Allaités ou non :</u></p> <p>NVP ou AZT pendant 4 à 6 semaines</p>



Recommandations de 2013

OPTION B+

OPTION B si éligibles

Femmes enceintes et allaitantes le plus tôt possible pendant la grossesse :

TDF+3TC (ou FTC)+EFV pendant la grossesse, le travail et l'accouchement puis tout au long de la vie*

*possibilité pour les femmes non éligibles de l'option B de prendre le même traitement et d'arrêter après l'accouchement

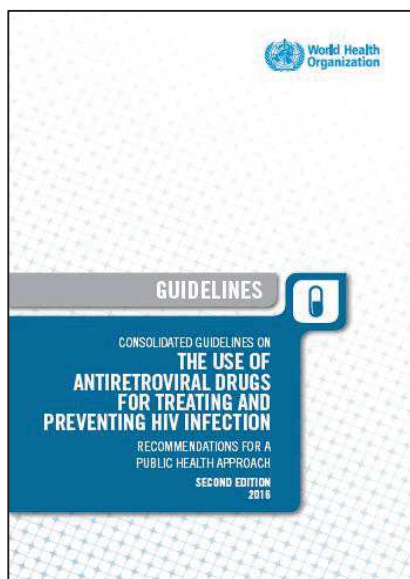
Nouveau-nés :

Allaités :

NVP pendant minimum 4 à 6 semaines jusqu'à 1 semaine après la fin de l'allaitement

Non allaités :

NVP ou AZT pendant 4 à 6 semaines



Recommandations de 2016

Toutes les femmes enceintes et allaitante le plus tôt possible pendant la grossesse :

TDF+3TC (ou FTC)+EFV pendant la grossesse, le travail et l'accouchement puis tout au long de la vie

Nouveau-nés :

Allaités :

NVP ou AZT+NVP pendant 12 semaines

Non allaités :

AZT+NVP pendant 6 semaines

2.2. Limitations des politiques de PTME et perspectives futures

2.2.1. Limitations des politiques de PTME

Si l'implémentation de l'option B+ a été largement adoptée dans les pays à ressources limitées et a permis un accroissement rapide de la couverture antirétrovirale chez les femmes infectées enceintes et allaitantes passant de 44% en 2010 à 85% en 2019 et une diminution considérable du nombre de nouvelles infections infantiles, les objectifs du millénaire quant à l'élimination de la TME du VIH ne sont malheureusement pas atteints avec encore 150 000 enfants nouvellement infectés contre les 20 000 escomptés pour 2020¹. A ce jour, aucune étude montrant la supériorité de l'option B+ par rapport à l'option A (incluant une prophylaxie longue chez l'enfant) n'a été conduite. Le choix de la recommandation de l'option B+ par l'OMS a été établi sur d'autres considérations que celle de la seule preuve scientifique. Depuis, les études portant sur l'évaluation de cette option pointent du doigt des obstacles majeurs limitant son efficacité. La rétention des femmes dans les centres de soins pendant six mois à un an après l'accouchement reste un problème important, avec un taux d'accompagnement aux soins faible variant d'un tiers à la moitié des femmes¹³¹⁻¹³⁴. Or, l'arrêt du TAR pendant la grossesse ou l'allaitement entraîne un rebond de la charge virale favorisant la transmission à l'enfant¹³⁵. De plus, en 2016, 20% des femmes enceintes vivant en Afrique Sub-Saharienne n'avaient pas accès aux centres de soins anténataux, ne pouvant ainsi pas bénéficier d'un dépistage VIH et d'une mise sous TAR en cas de séropositivité¹³⁶. La cascade de services (90/90/90) associée à la PTME du VIH reste d'ailleurs incomplète¹³⁷. Parmi les 21 pays prioritaires du Plan Mondial, la connaissance du statut sérologique VIH chez les femmes enceintes est supérieure ou égale à 90% pour seulement neuf pays, six étant en passe de le devenir. Seulement la moitié des pays atteignent également ce seuil selon l'indicateur de la couverture ARV des femmes connaissant leur statut (**Table 1.2**).

Cascade 90/90/90 associée à la PTME

Pays prioritaires du Plan mondial	Cascade 90/90/90 globale	Femmes enceintes connaissant leur statut VIH	Femmes enceintes vivant avec le VIH qui ont reçu des ARV pour la PTME
Tchad	ND/51/ND	ND ¹	56,0
Ethiopie	79/65/ND	89,0	92,0
Nigeria	67/53/42	41,0	44,0
Angola	42/27/ND	ND ¹	38,0
Cameroun	74/52/ND	86,0	80,0
Mozambique	72/56/ND	95,0	> 95,0
République Démocratique du Congo	62/57/ND	35,0	44,0
Ghana	57/34/ND	ND ¹	79,0
Zimbabwe	90/88/ND	86,0	94,0
Côte d'Ivoire	63/55/41	95,0 ²	90,0
Botswana	91/83/81	95,0	95,0
Kenya	89/68/ND	92,0	91,0
Afrique du Sud	90/62/64	88,0	82,0
Lesotho	86/61/57	40,0 ²	77,0
Zambie	87/78/59	89,0	> 95,0
Namibie	91/92/87	95,0 ¹	> 95,0
Ouganda	84/72/64	95,0	93,0
République-Unie de Tanzanie	78/71/62	91,0	93,0
Malawi	90/78/69	95,0	95,0
Eswatini	92/86/81	91,0	79,0
Burundi	ND/80/ND	84,0 ²	80,0

Table 1.2. Cascade 90/90/90 associée à la PTME en 2018 pour les 21 pays prioritaires d'Afrique Sub-Saharienne définis d'après le Plan mondial de l'OMS. ¹dernières données de 2015, ²dernières données de 2017. Abréviation : ND, non disponible. Sources : World Health Organization, HIV country profiles¹³⁸.

Par ailleurs, l'allaitement demeure un problème majeur dans la PTME du VIH. D'après le rapport 2020 du programme « Start Free. Stay Free. AIDS Free », l'allaitement maternel compte pour 49% des nouvelles infections infantiles à VIH dans les 21 pays prioritaires du Plan mondial (**Figure 1.4**)¹³⁷. Outre les raisons énoncées précédemment, un taux résiduel de transmission par l'allaitement estimé à 2,4-2,9% à un an existe, malgré un TAR maternel^{29,139}. Des cas de transmissions tardives, dont certaines par le lait maternel, à 5-6 ans ont également été rapportés¹⁴⁰. Ces enfants positifs ne sont pas inclus dans les différentes modélisations d'évaluation des programmes de PTME, laissant un groupe d'environ 100 000 enfants non diagnostiqués.

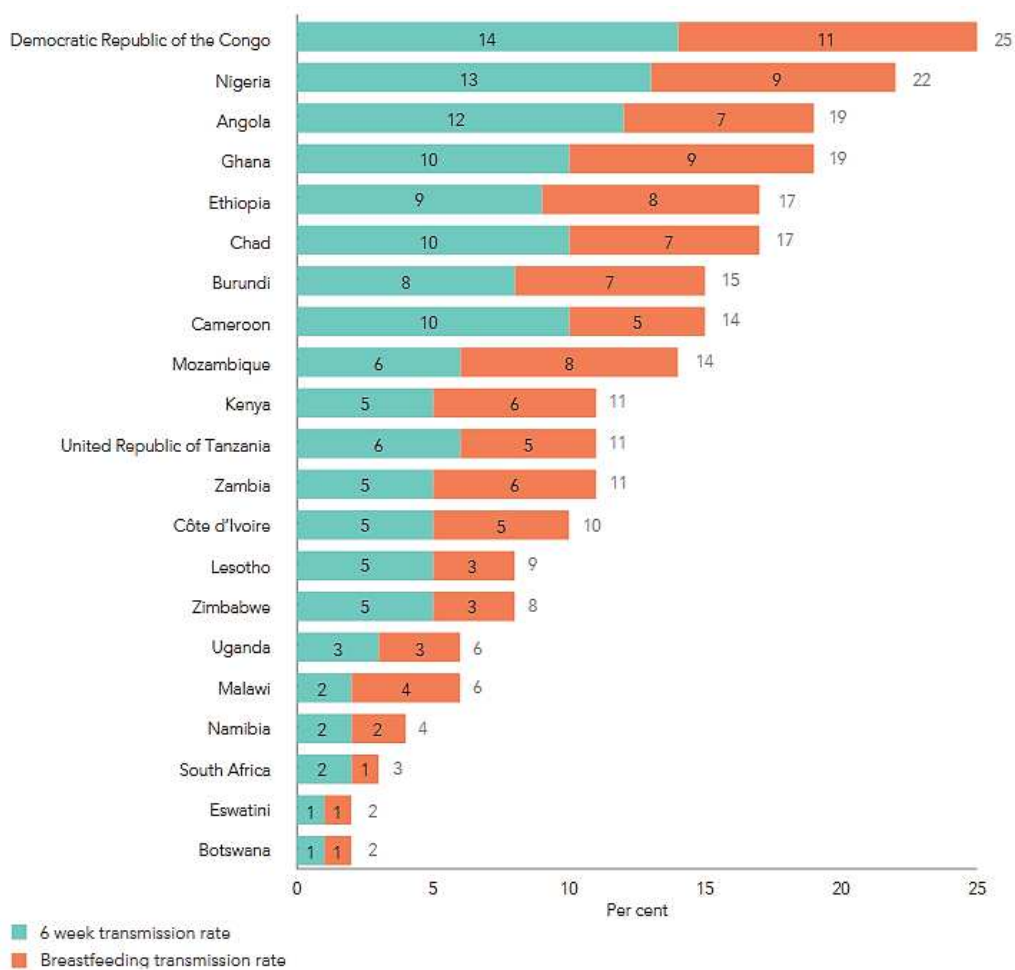


Figure 1.5. Taux de transmission mère-enfant du VIH dans les 21 pays prioritaires d’Afrique Sub-Saharienne en 2019. Source: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), *Progress towards the Start Free, Stay Free, AIDS free targets. 2020 report*¹³⁷.

2.2.2. Perspectives futures

Les limites des programmes de PTME actuels (option B+) mettent en exergue la nécessité de glisser vers une combinaison d'approches préventives innovantes afin de mettre fin à la TME du VIH, particulièrement par l'allaitement et dans les régions à fortes prévalence/incidence. Des stratégies additionnelles très prometteuses sont actuellement à l'essai¹⁴¹ et sont illustrées en **Figure 1.5**.

La découverte des anticorps neutralisants à large spectre (connus sous leur dénomination anglaise *broadly neutralizing antibodies* ou bNAbs) chez des individus infectés par le VIH a ouvert la voie à de multiples applications à la fois thérapeutiques et préventives pour lutter contre le virus¹⁴². En effet, ces anticorps possèdent à la fois la particularité de neutraliser plusieurs souches virales, et la capacité d'exercer leur action aussi bien sur les particules virales libres que sur les cellules infectées, permettant ainsi de prévenir l'infection ou d'induire la clairance virologique via un panel de processus immunologiques¹⁴². Une stratégie préventive portant sur l'utilisation de ces bNAbs par injection sous-cutanée chez les enfants exposés au VIH non infectés est en cours d'évaluation (NCT02256631). Les premières données sont encourageantes et révèlent une bonne tolérance des bNAbs chez les enfants¹⁴³. Leur action sur le long terme reste cependant à démontrer. Une deuxième approche, de type vaccin préventif, consisterait à administrer ces bNAbs à tous les nouveau-nés et/ou aux enfants allaités dans les régions du monde où la prévalence du VIH est forte¹⁴¹.

L'utilisation actuelle d'une prophylaxie antirétrovirale chez les femmes enceintes et allaitantes non infectées se heurte à une faible observance thérapeutique sur le long terme, notamment pour des raisons de stigmatisation, de minimisation du risque d'infection et de transmission à l'enfant ou bien encore du faible pouvoir décisionnel de la femme^{144,145}. Afin de pallier ce problème, des stratégies de prévention primaire chez ces femmes, employant des injections intramusculaires d'ARV à intervalles espacés pendant la grossesse et l'allaitement, ont été évaluées et révèlent une bonne tolérance¹⁴⁶. L'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité de cette stratégie chez les femmes non infectées et chez l'enfant allaité sont en cours d'investigation. La même approche fondée sur l'injection de bNAbs est également envisagée.

Enfin, des stratégies dites de « *rescue* » établies sur le dépistage du VIH en fin de grossesse et pendant l'allaitement peuvent venir compléter les approches précédemment décrites.

L'essai clinique randomisé contrôlé de phase III PROMISE EPI (ANRS12397 - NCT03870438), mené actuellement au Burkina Faso et en Zambie, constitue un exemple de ces stratégies. Cette étude inclut le dépistage des mères au cours de la deuxième visite du programme élargi de vaccination (entre 6 à 8 semaines suivant l'accouchement) concomitant à la mise sous TAR ou au renforcement du TAR pour les mères séropositives, et la mise sous prophylaxie antirétrovirale de tous les enfants exposés non infectés tant que la charge virale maternelle est ou reste détectable (supérieure à 1000 copies/mL), pendant une durée maximale de 10 mois (jusqu'au 12 mois de l'enfant). Si les résultats de cette intervention sont attendus pour la fin 2021, l'efficacité de l'utilisation d'une monoprofylaxie longue à base de 3TC ou de lopinavir/ritonavir chez les enfants allaités a par ailleurs déjà fait ses preuves lors de l'essai PROMISE PEP (ANRS 12174 - NCT00640263) conduit entre 2009 et 2014 en Afrique du Sud, Burkina Faso, Ouganda et Zambie^{147,148}.

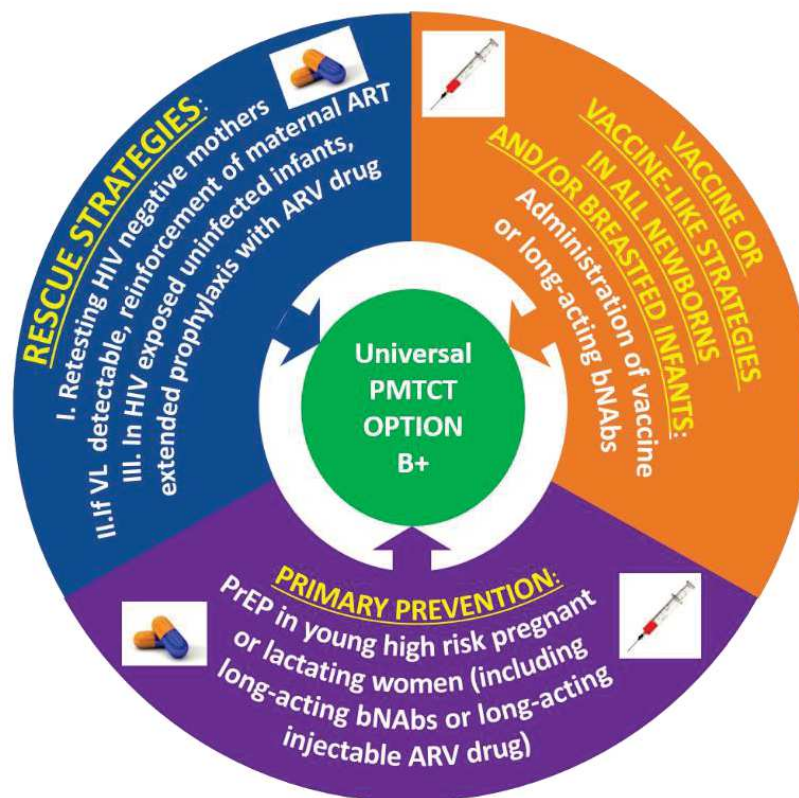


Figure 1.6. Intégration de stratégies préventives complémentaires à l'option B+ pour prévenir la transmission mère-enfant du VIH. Abréviations : PMTCT, prevention of mother-to-child transmission (PTME) ; HIV, Human Immunodeficiency virus (VIH) ; VL, viral load (charge virale) ; ART, antiretroviral therapy (TAR) ; ARV, antiretroviral ; bNAbs, broadly neutralizing antibodies ; PrEP, pre-exposure prophylaxis (prophylaxie pré-exposition). Source: modifié d'après Van de Perre et al. 2020, in press¹⁴¹.

Chapitre 2 : Emergence d'une nouvelle population : les enfants exposés au VIH et non infectés

Comme nous venons de le voir, les différentes stratégies mondiales mises en place depuis 2011 dans l'optique d'éradiquer la transmission du VIH de la mère à l'enfant ont considérablement réduit l'incidence du VIH parmi les enfants de moins de 15 ans. Cette décroissance du nombre de nouvelles infections infantiles s'accompagne de l'émergence d'une population grandissante d'enfants non infectés nés de mères séropositives (**Figure 2.1**). Ces enfants, connus sous la dénomination d'enfants exposés au VIH et non infectés (CHEU, de l'anglais *children who are HIV-exposed uninfected*), et plus particulièrement leur santé, font l'objet de ce second chapitre. Il convient de mentionner que cette désignation « CHEU » a récemment été proposée en remplacement de celle de « HEU » (de l'anglais *HIV-exposed uninfected*) suite au « 5th HIV-exposed uninfected child and adolescent Workshop » tenu en juillet 2019 à Mexico, dans une volonté internationale d'être plus centré sur les enfants que sur le VIH¹⁴⁹.

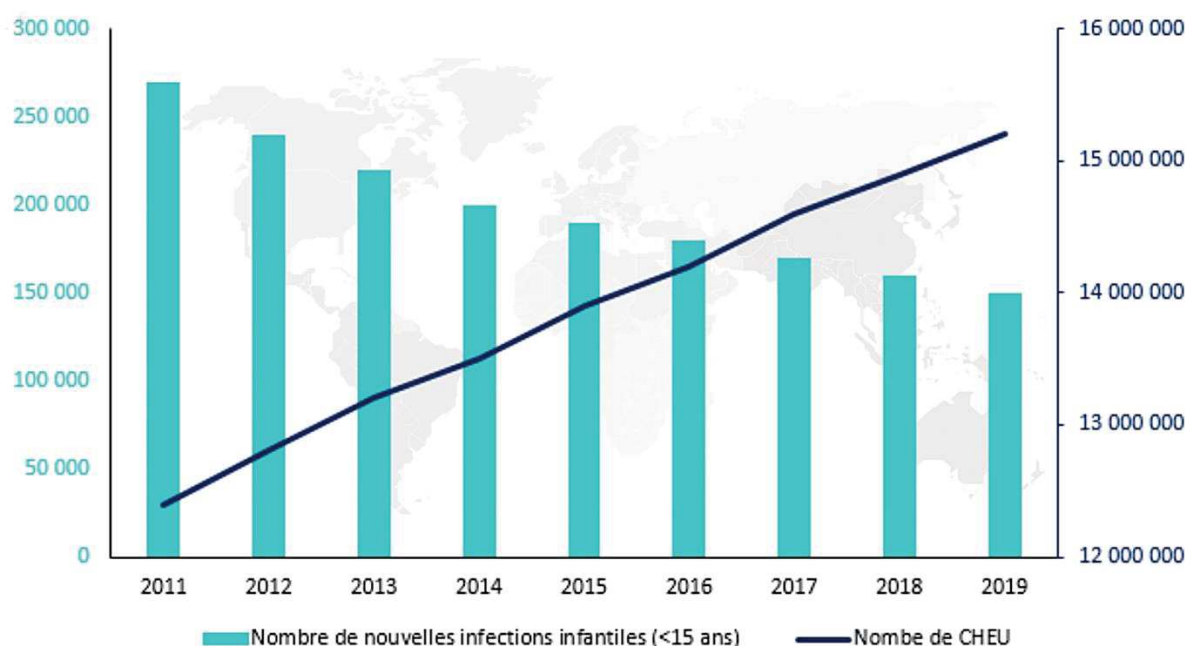


Figure 2.1. Nombre de nouvelles infections à VIH parmi les enfants de moins de 15 ans et nombre d'enfants exposés non infectés sur la période 2011-2019. Abréviations : CHEU, enfants exposés au VIH non infectés. Source : données ONUSIDA de 2011 à 2019¹.

I. Epidémiologie

En 2019, ONUSIDA estimait à 15,2 millions le nombre de CHEU à travers le monde dont 13.7 millions en Afrique Sub-Saharienne (**Figure 2.2**)¹.

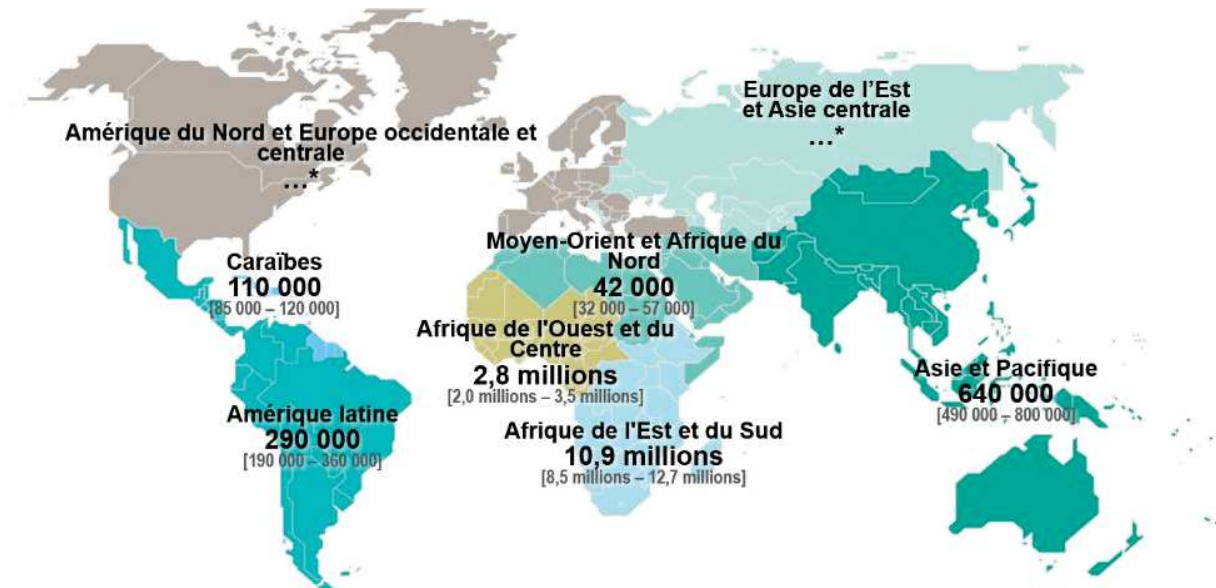


Figure 2.2. Estimation du nombre d'enfants exposés au VIH et non infectés en 2019. *Les estimations du nombre d'enfants ne sont pas publiées en raison des chiffres réduits. Adapté d'après : ONUSIDA juillet 2020, Diapositives clés sur les données épidémiologiques².

Cinq pays du continent africain (quatre en Afrique de l'Ouest et du Centre et un en Afrique de l'Est et du Sud) regroupaient à eux seuls plus de 50% de la population mondiale de CHEU en 2019 : l'Afrique du Sud (3,8 millions de CHEU), l'Ouganda (1,1 millions de CHEU), le Mozambique (990 000 CHEU), le Nigéria (900 000 CHEU) et la République Unie de Tanzanie (890 000 CHEU)¹.

II. Santé des enfants exposés au VIH non infectés

1. Pourquoi s'intéresser à la santé des enfants exposés au VIH non infectés ?

La santé d'un individu est un processus dynamique se poursuivant tout au long de la vie et dont la trajectoire, qu'elle soit bonne ou mauvaise, peut être orientée dès le plus jeune âge. La susceptibilité à une maladie se trouve en effet particulièrement influencée par des facteurs biologiques, comportementaux et psychosociaux intervenant pendant des périodes dites critiques (effets totalement ou partiellement irréversibles) ou sensibles de la vie (réversibilité des effets possibles)^{150,151}.

Cette « programmation fœtale », connue sous le nom d'« Hypothèse de Barker » ou « hypothèse d'une origine fœtale des maladies de l'adulte », a été pour la première fois proposée en 1985 par l'épidémiologiste anglais David Barker qui montra une association entre un faible poids à la naissance et l'augmentation de la susceptibilité aux maladies cardiovasculaires¹⁵⁰. L'hypothèse de l'hygiène vient également en appui à ce postulat : le manque d'exposition à des agents infectieux pendant l'enfance entraînerait une augmentation de la susceptibilité aux allergies et aux maladies auto-immunes¹⁵². Par ailleurs, l'environnement intra-utérin joue aussi un rôle essentiel dans la programmation à long terme de la santé du bébé, particulièrement dans l'enrichissement et la maturation du microbiote intestinal infantile mais également dans la maturation de son système immunitaire¹⁵³. On estime ainsi que les 1 000 premiers jours de la vie d'un individu, soit de la conception à 2 ans, sont cruciaux pour l'évolution de sa santé.

2. Santé des enfants exposés au VIH non infectés

La santé des CHEU fait l'objet d'une littérature abondante rapportant un large spectre de problèmes (**Table 2.1**). Ces enfants présentent notamment un risque plus important de mortalité et de morbidité, aussi bien dans les pays à ressources limitées que dans les pays à fortes ressources, comparé à des enfants non exposés au VIH non infectés (CHUU, de l'anglais *children who are HIV-unexposed uninfected*)¹⁵⁴⁻¹⁵⁹. Cette mortalité serait en particulier due à une susceptibilité plus importante aux infections infantiles telles que les pneumonies et les gastro-entérites^{157,160-162}. Une récente étude souligne par ailleurs un lien potentiel entre cette susceptibilité aux maladies infectieuses et l'altération du système immunitaire de ces enfants¹⁶⁰, marquée entre autre par une atteinte de la réponse humorale et un environnement pro-inflammatoire¹⁶³⁻¹⁶⁹. D'autres travaux ont également rapportés une prévalence plus importante de CHEU présentant un retard de croissance¹⁷⁰⁻¹⁷⁷, ainsi qu'une augmentation – bien que rare – de l'incidence des cancers dans certains cas¹⁷⁸⁻¹⁸⁰, mais aussi une augmentation du risque de présenter des anomalies congénitales^{181,182} et dysfonctions cardiaques¹⁸³⁻¹⁸⁸, rénales^{189,190} et métaboliques¹⁹¹⁻¹⁹⁶. L'évaluation neurologique des CHEU fait également l'objet d'une attention particulière. Cette évaluation est, dans sa généralité, rendue difficile par une multitude de variables confondantes pouvant affecter le développement neurocognitif des jeunes enfants telles que le niveau d'éducation de la mère ou le revenu familial, variables qui ne sont pas forcément prises en compte dans les analyses, mais aussi par la mesure des performances cognitives chez des CHEU de tout âge.

Si certaines études n'ont pas rapporté de différences avec les CHUU¹⁹⁷⁻²⁰², d'autres ont cependant mis en évidence une augmentation du risque de présenter un retard dans le développement neurocognitif, dans l'expression du langage et dans les capacités motrices de ces enfants²⁰³⁻²¹². Enfin, la toxicité mitochondriale occupe une place importante dans la littérature des CHEU et sera abordée plus en détails dans le chapitre 3 de cette thèse.

Contrairement aux mères qui continuent d'être suivies à vie pour leur TAR, le suivi spécifique des CHEU s'arrête à l'âge de deux ans, avec la fin des programmes de PTME du VIH. Toutefois, une proportion non négligeable de CHEU continue d'être allaités dans les pays africains après l'âge de deux ans et le taux de transmission n'est malheureusement pas négligeable pour cette période¹⁴⁰. Dans ces régions du monde, l'allaitement est plus qu'un mode d'alimentation du nourrisson mais une pratique culturelle dont dépend la survie du nouveau-né et du jeune enfant. L'évaluation de la balance bénéfique/risque de l'allaitement exclusif des CHEU a été menée lors de l'étude EBF (*Exclusive BreastFeeding*, ClinicalTrials.gov : NCT00397150) et est à la base des recommandations actuelles de l'OMS. La multiplicité des problèmes de santé que nous venons de mentionner questionne sur la mise en place d'un suivi adapté à ces enfants, suivi qui pourrait par exemple être inclus dans les recommandations nationales. Enfin, tous les CHEU ne présenteront pas des signes sub-cliniques ou cliniques de leur exposition au VIH ou aux ARV, ainsi leur dépistage précoce permettrait une prise en charge médicale plus rapide et adaptée, assurant un meilleur suivi garant de leur santé.

Les périodes critiques et sensibles de la vie ci-dessus mentionnées ainsi que les différents problèmes de santé observés chez les CHEU, en lien avec la double exposition de ces enfants au VIH et aux ARV dès leur vie intra-utérine, soulèvent ainsi la problématique de la toxicité de ces derniers et de leurs conséquences potentielles sur la santé de ces enfants. Nous nous concentrerons sur leur impact sur le génome des CHEU lors du chapitre 3.

Indicateur	Commentaires	Références
Mortalité et morbidité	Taux de mortalité de 2 à 4 fois plus important que les CHUU	154–159
Système immunitaire/ inflammation	Diminution de la concentration des immunoglobulines G (IgG) maternels transférés aux nouveau-nés, notamment les IgG anti-tétanos, anti-rougeole, anti- <i>Haemophilus influenzae</i> B, anti-pneumococcus et anti-Streptococcus du Groupe B Augmentation de la concentration de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-6) et de chimiokines (interleukine-8) Augmentation de l'inflammation et de l'activation des monocytes	160,163–169
Susceptibilité aux infections	Augmentation de l'incidence des hospitalisations et de la sévérité des infections : gastroentérites, sepsis, méningites et pneumonies Augmentation de l'incidence des maladies infectieuses, qu'elles soient d'origine fongique (<i>Pneumocystis jirovecii</i> , <i>Candida</i>), virale (virus respiratoire syncytial, <i>Rhinovirus</i> , <i>Enterovirus</i> , <i>Adenovirus</i>) ou bactérienne (en particulier par les bactéries encapsulées : <i>Streptococcus Groupe B</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>)	157,160–162
Anomalies congénitales	Cardiaques et musculosquelettiques	181,182
Cancers	En particulier observés chez des enfants exposés <i>in utero</i> à la didanosine Leucémies, lymphomes, rétinoblastomes, rhabdomyosarcomes et cancers liés au système nerveux central	178–180
Dysfonction cardiaque	Altération structurale et fonctionnelle du ventricule gauche : réduction ou augmentation de la masse, réduction de la dimension et de l'épaisseur septale, augmentation de la contractilité, dysfonctionnement diastolique (troubles de la relaxation et de la compliance)	183–188
Altérations métaboliques	Hyperlactatémie, résistance à l'insuline, dyslipidémie, obésité	191–196
Dysfonction rénale	Taux élevés des hormones surrénaliennes 17-hydroxyprogestérone et déhydroépiandrostérone Des taux hormonaux importants peuvent entraîner des signes de virilisation chez les filles et l'arrêt des menstruations	189,190
Croissance	Scores poids-pour-âge, taille-pour-âge, poids-pour-taille inférieurs à ceux observés chez les CHUU	170–177
Développement neurocognitif	Retard du développement neurocognitif, du développement du langage et des capacités motrices	203–212
Toxicité mitochondriale	Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, altération du nombre de copies d'ADN mitochondrial	Chapitre 3

Table 2.1. Aperçu des problèmes de santé observés chez les enfants exposés au VIH non infectés.

Chapitre 3 : Toxicité génomique des traitements antirétroviraux

Les ARV sont regroupés en plusieurs classes en fonction de l'étape du cycle de réplication du VIH qu'ils inhibent²¹⁵. Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) et les inhibiteurs de la protéase (IP) sont les trois catégories le plus représentées dans les TAR de première ligne. On distingue par ailleurs les inhibiteurs de fusion, les antagonistes CCR5, les inhibiteurs de l'intégrase, les inhibiteurs d'attachement, les inhibiteurs de post-attachement et les boosters pharmacocinétiques employés conjointement avec un autre ARV afin d'en augmenter sa biodisponibilité.

Depuis deux décennies, une littérature grandissante suggère que le dysfonctionnement des mitochondries, observé d'une façon générale chez les personnes vivant avec le VIH (PLWH, de l'anglais *people living with HIV*), lié à l'utilisation des ARV expliquerait en partie les problèmes de santé rapportés chez les CHEU et mentionnés dans le chapitre précédent. Cette question d'un effet délétère lié à une exposition aux ARV pendant la grossesse et l'allaitement ou en prophylaxie infantile postnatale sur le génome des CHEU est légitime, les ARV étant connus pour traverser la barrière placentaire et pour être sécrétés dans le lait maternel²¹⁶. D'un autre côté, l'éventualité d'un vieillissement prématuré des CHEU, bien décrite chez les PLWH, qui recouperait le dysfonctionnement mitochondrial et jouerait un rôle prépondérant dans les manifestations cliniques de la prise des ARV commence à émerger dans la littérature. L'incorporation de certains ARV, et plus particulièrement de l'AZT, à la fois dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) et dans l'ADN nucléaire (ADNn) préférentiellement au niveau des télomères des chromosomes a par ailleurs été observée *in vitro*²¹⁷. Dans ce chapitre, nous aborderons plus en détails ces deux toxicités génomiques liés à l'utilisation des ARV chez les CHEU.

I. Toxicité mitochondriale des antirétroviraux

1. Généralités sur les mitochondries

1.1. *Origine et structure des mitochondries*

Les mitochondries sont des organites intracellulaires présents dans le cytoplasme de toutes les cellules Eucaryotes à l'exception des globules rouges. En 1857, le biologiste suisse Rudolph A. von Kölliker fut le premier à observer ces structures qu'il appela « corpuscules ». La dénomination définitive mitochondrie, du grec *mitos* signifiant « fil » et *chondros* signifiant « granule », sera finalement proposée par Carl Brenda quelques décennies plus tard, en 1898.

En 1967, fondée sur leurs ressemblances structurale et fonctionnelle avec les bactéries, la microbiologiste américaine Lynn Margulis propose la « théorie endosymbiotique » selon laquelle les mitochondries des cellules Eucaryotes seraient le vestige d'une relation symbiotique avec un procaryote²¹⁶. De récentes recherches phylogénétiques ont permis d'identifier une Archéobactérie anaérobie de la lignée *Lokiarchaeota* en tant que cellule hôte primaire^{217,218}. Celle-ci aurait endocytée une α -proteobactérie aérobie du genre *Rickettsia*. Au cours de leur évolution symbiotique, une partie des gènes de cette dernière auraient été transférée vers le génome nucléaire, donnant naissance à la mitochondrie.

Le nombre de mitochondries est variable selon le type cellulaire et les besoins énergétiques de la cellule et est finement régulé par un équilibre entre biogenèse mitochondriale et mitophagie²¹⁹⁻²²¹. Les mitochondries forment un réseau intracellulaire dynamique, par l'alternance de cycles de fission et de fusion, leur taille variant alors de 1 à 10 μM de long et de 0.5 à 1 μM de large²²².

L'origine endosymbiotique des mitochondries leur confèrent des propriétés structurales semblables aux bactéries^{216,223,224}. Elles sont notamment dotées d'une double membrane délimitant un espace intermembranaire d'environ 20 nM de large, équivalent au périplasme bactérien. La membrane externe mitochondriale est constituée de nombreuses porines laissant passer les ions et les molécules de faible poids moléculaire. A l'inverse, la membrane interne mitochondriale est hautement sélective : le passage de toute molécule requiert un transporteur spécifique. Cette membrane interne comporte de nombreuses invaginations appelées crêtes mitochondriales, qui s'étendent dans la matrice mitochondriale, homologue du cytoplasme des bactéries^{223,225}.

Celle-ci est le siège de nombreuses réactions enzymatiques et de plusieurs processus biologiques incluant la réplication de l'ADNmt, sa transcription et la biogenèse protéique (**Figure 3.1**).

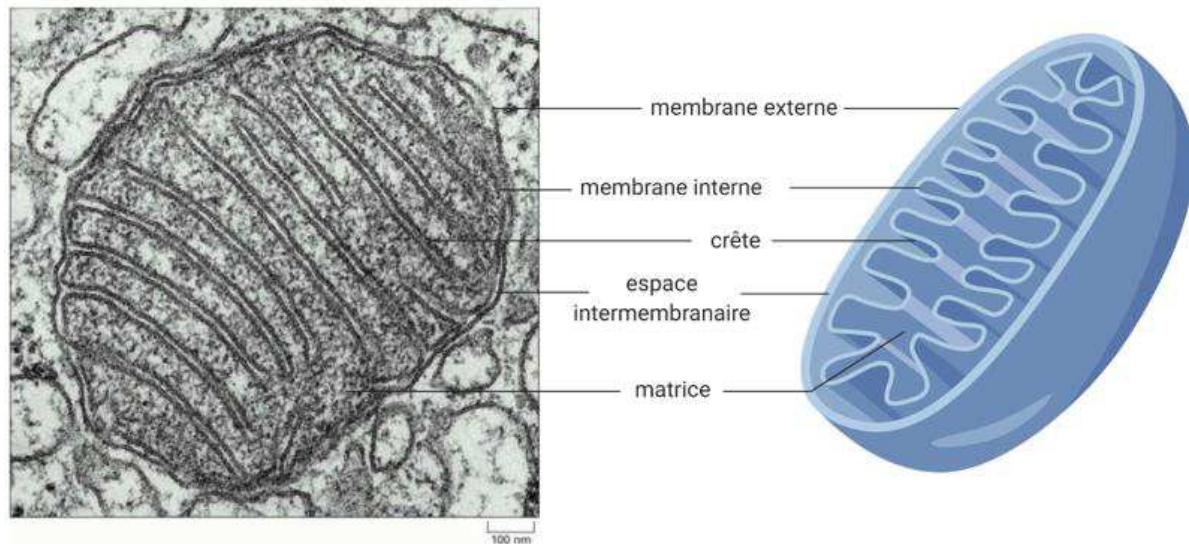


Figure 3.1. Structure d'une mitochondrie. Gauche : micrographie d'une mitochondrie hépatique humaine par microscopie électronique à transmission. Droite : représentation schématique d'une mitochondrie. Source : Alberts et al., 2002²²⁵. Illustration créée sur Biorender.com.

1.2. Fonctions des mitochondries

Les mitochondries jouent un rôle majeur dans la production d'énergie cellulaire. 90% de l'énergie dont notre organisme a besoin pour fonctionner est produit par les mitochondries²²⁶. Cette production d'énergie, qui se fait sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) directement assimilable par l'organisme, est permise grâce à une cascade de phosphorylations oxydatives se déroulant le long des chaînes respiratoires mitochondriales présentes sur la membrane interne²²⁷. Ces réactions d'oxydoréductions sont assurées par 5 complexes protéiques codés à la fois par l'ADNmt et par l'ADNn. Quatre de ces complexes, I à IV, constituent la chaîne de transport des électrons (**Figure 3.2**). L'oxydation des différents donneurs d'électrons génère la production de protons H^+ qui sont pompés de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV, générant un gradient électrochimique de protons appelé force proton motrice, de part et d'autre de la membrane interne. L'énergie correspondante à ce gradient est ensuite utilisée par l'ATP synthase, également appelé

complexe V, qui va permettre le retour des protons vers la matrice mitochondriale en catalysant la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP.

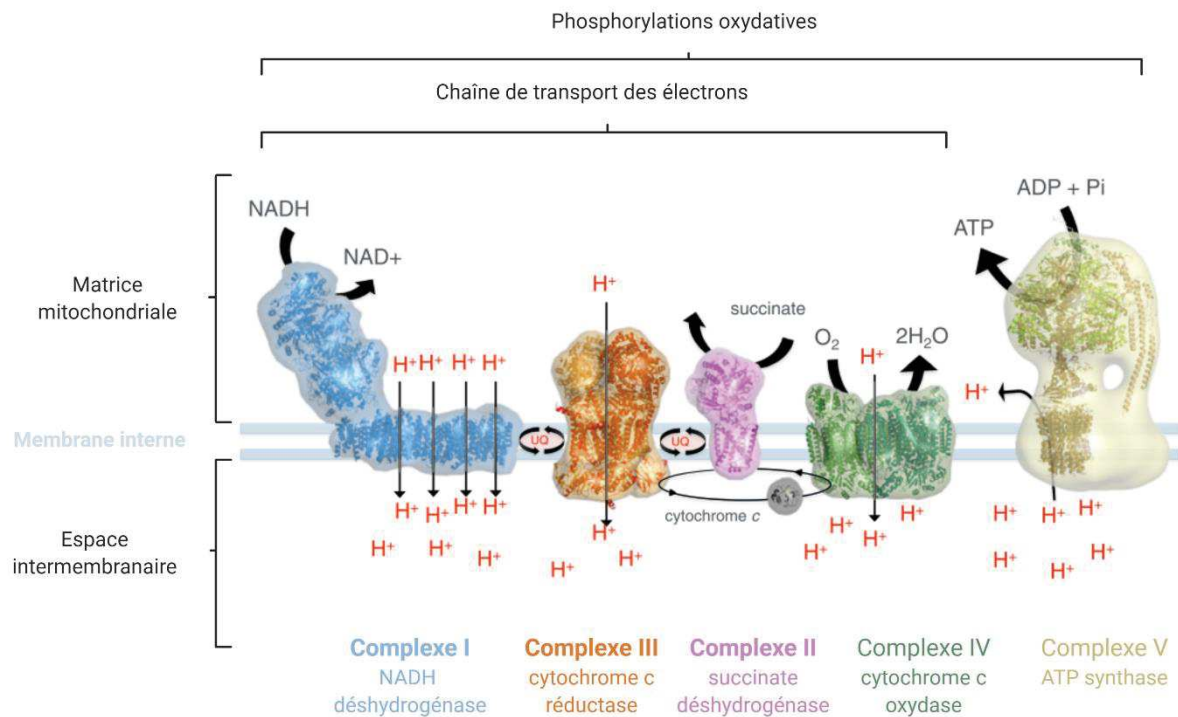


Figure 3.2. Complexes mitochondriaux participant aux phosphorylations oxydatives au sein de la membrane interne mitochondriale. Source : modifié d'après Kühlbrandt et al., 2015²²⁷.

Outre leur rôle pilier dans la production d'énergie, les mitochondries sont également au cœur de nombreux processus cellulaires et voies métaboliques^{228,229}. Elles participent notamment au cycle de Krebs lui-même impliqué dans la néoglucogenèse, la biogenèse des hèmes et des protéines Fer/Soufre, la biogenèse des acides aminés, la synthèse des nucléotides pyrimidiques et des hormones stéroïdes mais aussi dans des réactions cataboliques comme la glycolyse, la β -oxydation des acides gras, le cycle de l'urée ou bien encore la dégradation des acides aminés.

1.3. Génétique mitochondriale

1.3.1. Localisation et structure de l'ADN mitochondrial

En raison de leur origine endosymbiotique, les mitochondries possèdent leur propre ADN et machineries nécessaires à sa réplication, transcription et traduction.

L'ADNmt est présent dans la matrice mitochondriale, compacté au sein de complexes nucléoprotéiques attachés à la membrane interne appelés nucléoïdes^{225,230}. Les mitochondries peuvent contenir jusqu'à 1 000 nucléoïdes²³¹. Ces structures d'environ 100 nM de diamètre comportent le plus souvent une seule molécule ADNmt ainsi qu'une trentaine de protéines impliquées dans sa réplication, notamment l'ADN polymérase gamma (γ), et sa transcription²³⁰⁻²³².

La séquence de l'ADNmt humain, plus communément appelée séquence CRS (*Cambridge Reference Sequence*), a été décrite pour la première fois en 1981²³³, puis révisée en 1999²³⁴. Chez l'Homme, le génome mitochondrial consiste en une molécule circulaire bicaténaire de 16 569 paires de bases dont les deux brins diffèrent par leur composition en bases (**Figure 3.3**)^{233,235,236}. La séparation en fonction de leur densité sur un gradient de chlorure césium permet ainsi de distinguer un brin lourd, ou brin H (de l'anglais *Heavy strand*) riche en guanines, et un brin léger, ou brin L (de l'anglais *Light strand*)²³⁷. Les 37 gènes que comporte l'ADNmt sont dépourvus d'introns et sont distribués différenciellement sur ces deux brins. Le brin H porte ainsi 12 ARN messagers (ARNm), 2 ARN ribosomiques (ARNr 12S et 16S) et 14 ARN de transfert (ARNt). Le brin L porte quant à lui un ARNm et 8 ARNt (**Figure 3.3**)²³⁸. Les 13 ARNm codent pour certaines sous-unités protéiques des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), les autres sous-unités constituant ces complexes étant codées par le génome nucléaire. Seul le complexe II est entièrement codé par ce dernier. Les autres protéines mitochondriale, le protéome comportant environ 1 500 protéines, sont codées par le génome nucléaire²³⁹.

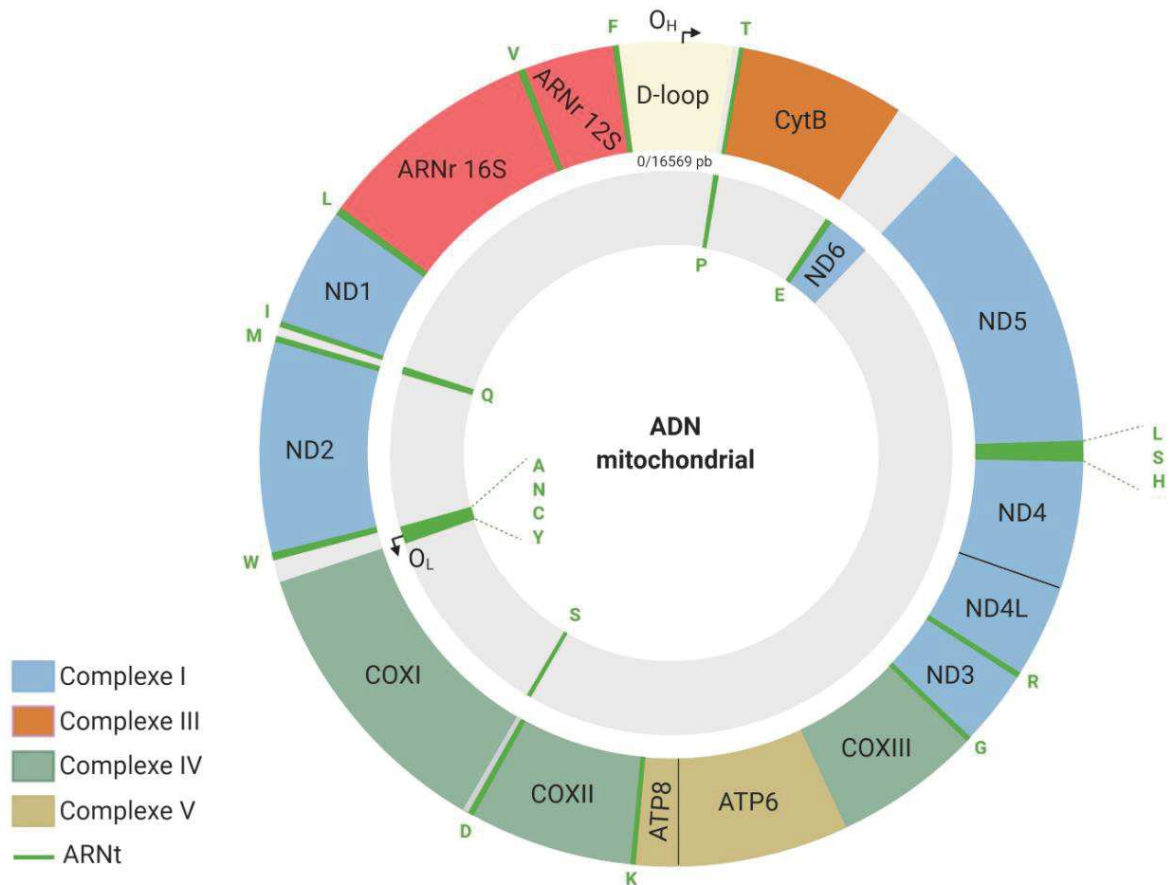


Figure 3.3. Organisation génétique de l'ADN mitochondrial humain. *ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 et ND6* codent pour les sous-unités protéiques du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale ; *CytB* code pour celle du complexe III ; *COXI, COXII et COXIII* codent pour celles du complexe IV ; *ATP6 et ATP8* codent pour celles du complexes V ; *OH*, origine de réplication du brin lourd ; *OL*, origine de réplication du brin léger. Les ARN de transfert (*ARNt*) sont représentés par leur lettre (acide aminé). Abréviations : *ADN*, acide désoxyribonucléique ; *CytB*, cytochrome B ; *ARNt*, ARN de transfert. Illustration créée sur *Biorender.com*.

Contrairement au génome nucléaire, l'ADNmt contient très peu de régions non-codantes, représentant seulement 3% de ce génome. Parmi elles, une région contrôle d'environ 1.1 kilobases appelée D-loop, ou boucle de déplacement, est très bien caractérisée et comporte les promoteurs de transcription des brins H et L ainsi que l'origine de réplication du brin H (O_H). L'origine de réplication du brin L (O_L) se trouve quant à elle en dehors de cette région non codante²⁴⁰ (**Figure 3.3**).

Autre particularité mitochondriale, le code génétique de la mitochondrie diffère du code génétique universel, avec 4 codons sur 64 codant pour les protéines différentes.

1.3.2. Mutations de l'ADN mitochondrial et haplogroupes mitochondriaux

Plusieurs spécificités propres à l'ADNmt le rendent particulièrement susceptible à l'apparition de mutations en comparaison à l'ADNn. Un élément majeur réside dans la proximité du lieu de synthèse de l'ADNmt avec la CRM, source principale de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ERO)²⁴¹. L'ADNmt n'étant pas complexé à des histones, il se trouve d'autant plus vulnérable aux ERO pouvant endommager l'ADN et induire des mutations^{241,242}. Un autre aspect concerne l'enzyme intervenant dans la réplication de l'ADNmt, l'ADN polymérase γ . Bien que cette enzyme présente une fidélité élevée à l'instar des autres polymérases cellulaires²⁴³⁻²⁴⁵, son activité exonucléase 3'-5' de « relecture » se trouve fortement impactée par l'environnement hautement réactif de la matrice mitochondriale, conduisant à l'augmentation de mutations²⁴⁶. On estime ainsi que le taux de mutation de l'ADNmt est 10 à 20 fois plus élevé que celui de l'ADN nucléaire. Il est aujourd'hui reconnu que l'accumulation des mutations générées par les ERO dans l'ADNmt joue un rôle fondamental dans le processus de vieillissement, et fonde la « Théorie mitochondriale du vieillissement » proposée par Denham Harman en 1972²⁴⁷.

Les mutations de l'ADNmt incluent des mutations ponctuelles ou des réarrangements type délétions, duplications ou insertions. La première mutation mitochondriale, de type délétion, a été décrite en 1988 chez des patients atteints de myopathies mitochondriales²⁴⁸. Depuis, de nombreuses autres mutations ont été identifiées et sont recensées dans la base de données MITOMAP depuis 1996²⁴⁹.

La séquence d'ADNmt propre à un individu définit son haplotype, caractérisé par des polymorphismes uniques (SNP, *single nucleotide polymorphism*) dérivant de la séquence CRS. Plusieurs haplotypes partageant des variants (SNP) communs issus du même ancêtre, appelé l'Eve mitochondriale ou plus récent ancêtre matrilineaire commun (mt-MRCA, de l'anglais *matrilineal most recent common ancestor*) sont regroupés en haplogroupes²⁵⁰. Au fil des millénaires, les polymorphismes accumulés depuis cet ancêtre et les migrations de populations ont donné naissance à plusieurs haplogroupes répartis à la surface du globe (**Figure 3.4**). La séquence CRS est issue de l'haplogroupe H.

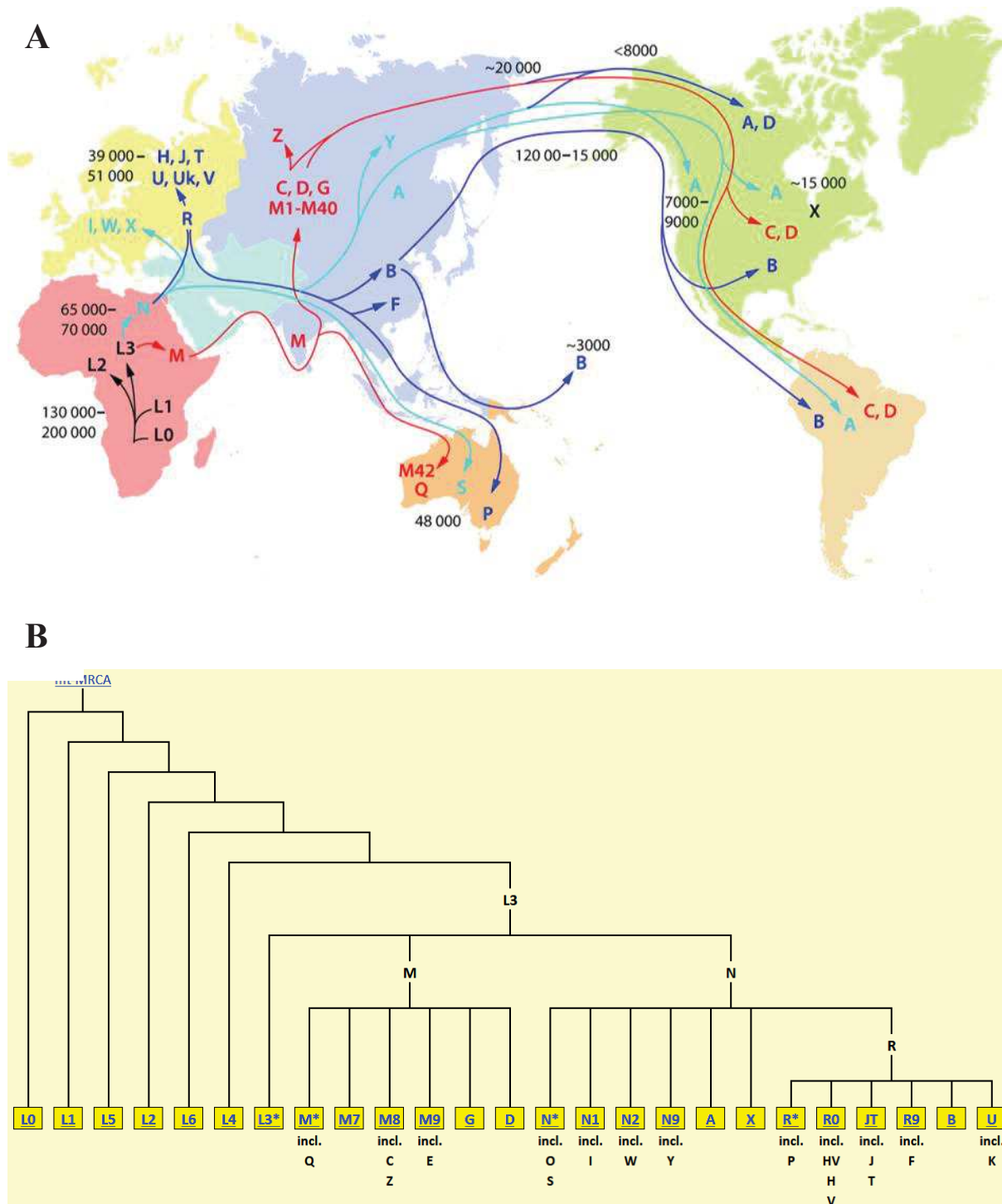


Figure 3.4. Haplogroupes mitochondriaux. (A) Répartition et émergence des différents haplogroupes mitochondriaux à la surface du globe suite aux migrations de populations. Source : Wallace 2013²⁵⁰ (B) Arbre phylogénétique des variations de l'ADNmt définissant les haplogroupes mitochondriaux, depuis l'ancêtre matrilineaire commun. Dernière mise à jour de février 2016. Abréviation : mt-MRCA, matrilineal most recent common ancestor (plus récent ancêtre matrilineaire commun) Source : <https://www.phylotree.org/>²⁵¹.

1.4 Maladies mitochondriales

Les maladies mitochondriales constituent un groupe très hétérogène de pathologies pouvant survenir à tout âge et sont caractérisées par la déficience conjointe dans la production énergétique et dans l'activité enzymatique d'un ou de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire^{252,253}. En raison de la distribution ubiquitaire des mitochondries au sein de l'organisme, les symptômes associés à cette dysfonction mitochondriale peuvent affecter tous les organes (**Figure 3.5**), préférentiellement le système nerveux central et les muscles, tous deux hautement consommateurs d'énergie²⁵⁴. Si la plupart des pathologies mitochondriales présentent des atteintes multi-viscérales, d'autres peuvent cependant être restreintes à un seul tissu.

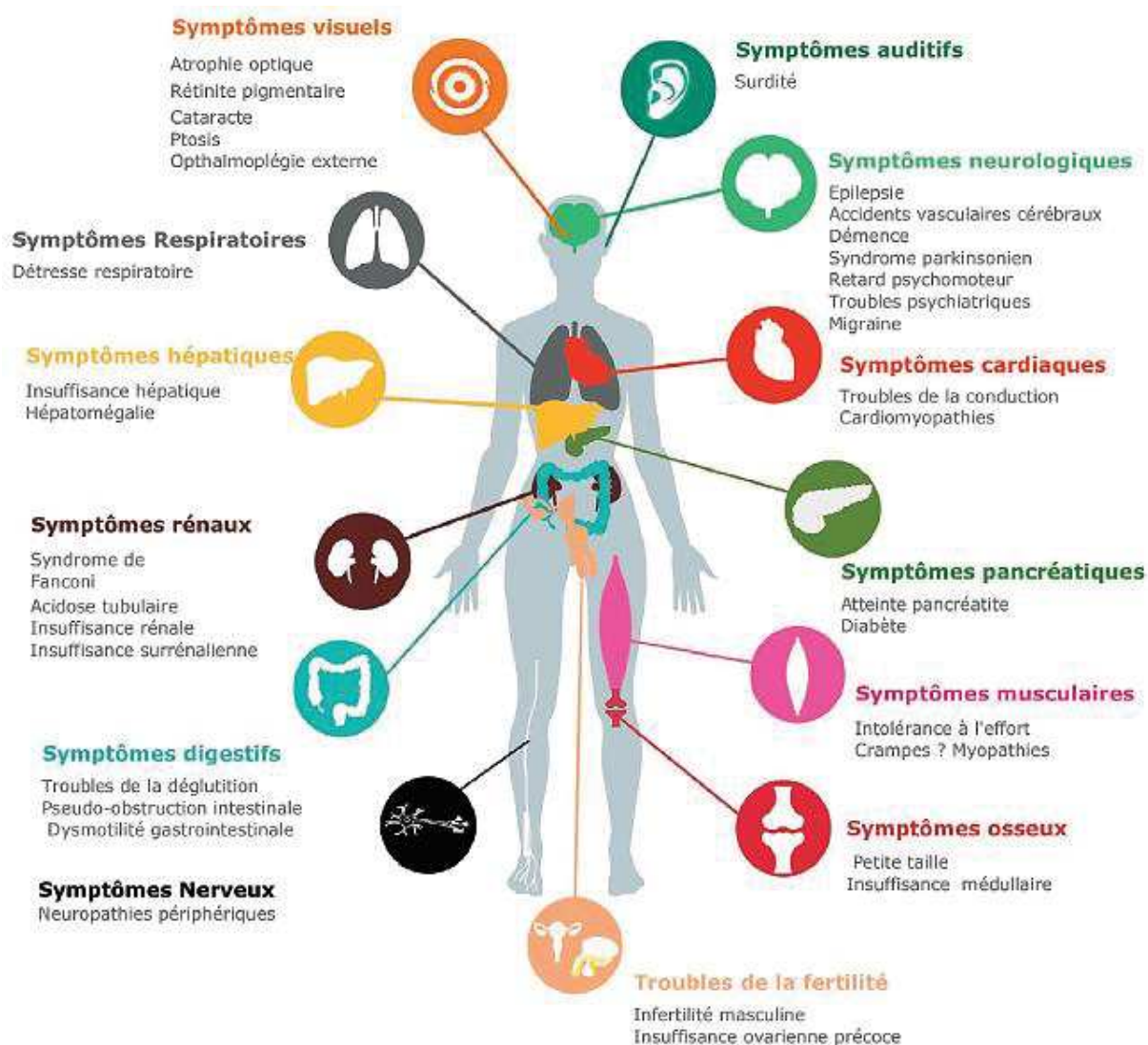


Figure 3.5. Panel des principaux symptômes cliniques observés dans les pathologies mitochondriales. *Source : Procaccio et al., 2018²⁵⁴.*

Le diagnostic des pathologies mitochondriales ne suit pas de « *gold standard* » particulier et repose sur l'observation de signes cliniques couplée à des explorations métaboliques (recherche d'une hyperlactatémie et de l'accumulation du NADH), enzymatiques (analyse de la consommation en oxygène par polarographie et analyse de l'activité enzymatique des complexes de la CRM par spectrophotométrie, à partir de biopsies), histologiques (prolifération des mitochondries) et d'imagerie cérébrale. Seule l'investigation génétique par l'identification du gène responsable permet toutefois de confirmer ou non le diagnostic.

L'étiologie des mitochondriopathies repose sur des altérations de l'ADNmt classées en trois catégories et dont l'origine est multiple^{252,253,255,256}. On distingue ainsi les mutations ponctuelles, altérations de l'ADNmt le plus fréquemment retrouvées ; les réarrangements de type délétions simples ou multiples, mais aussi insertions et transitions dans une moindre mesure ; et la déplétion de l'ADNmt principalement observée dans des myopathies infantiles. Les mutations ponctuelles sont le plus souvent héritées de la mère, l'ADNmt étant transmis exclusivement à la descendance par l'oocyte²⁵⁷, mais peuvent également apparaître de façon sporadique. Elles affectent principalement les gènes codant pour des protéines de la CRM. Les délétions simples apparaissent généralement *de novo* contrairement aux délétions multiples et aux déplétions qui découlent d'une mutation dans les gènes nucléaires impliqués dans la maintenance ou la réplication de l'ADNmt. Les pathologies mitochondriales peuvent ainsi résulter à la fois de mutations dans le génome nucléaire et mitochondrial.

Ces altérations mitochondriales n'ont, le plus souvent, pas de conséquence phénotypique. Entre alors en jeu la notion d'hétéroplasmie mitochondriale, définie par la coexistence de génomes mitochondriaux mutés et normaux au sein d'une mitochondrie²⁵⁸. L'apparition et la sévérité de la pathologie dépend du taux d'hétéroplasmie. Lorsque celui-ci dépasse un seuil propre au type de mutation et au tissu observé, la dysfonction mitochondriale peut se manifester à l'échelle phénotypique. Pour les mutations ponctuelles on estime ainsi par exemple que le seuil d'expression clinique moyen, bien que très variable selon les variants, se situe autour de 70%. En revanche, pour les délétions et la déplétion de l'ADNmt, il n'existe pas de seuil pré-établi. L'expression clinique est par ailleurs dépendante d'autres variables telles que l'âge, le fond génétique, le tissu analysé, etc. A ce titre, il convient de remarquer qu'il n'existe à ce jour aucune valeur de référence de l'ADNmt au sein des populations, ni de son évolution au cours de la vie. C'est finalement la confrontation de l'ensemble des observations cliniques et des données biologiques radiologiques et génétiques qui permettent de poser un diagnostic.

Outre son implication dans les pathologies mitochondriales, l'ADNmt peut également jouer un rôle dans des maladies non mitochondriales comme le diabète, la maladie d'Alzheimer ou bien encore celle de Parkinson^{259,260}.

2. Mitochondries dans le contexte VIH

L'existence de dysfonctions mitochondriales chez les PLWH est connue de longue date et est fortement mis en cause dans la plupart des effets secondaires liés à l'infection virale et/ou à l'utilisation des ARV²⁶¹.

2.1. Toxicité mitochondriale chez les personnes vivant avec le VIH

Les PLWH présentent un nombre de copies d'ADNmt plus faible comparé à celui rapporté chez des individus non infectés²⁶²⁻²⁷⁵. La contribution du VIH dans cette déplétion est aujourd'hui clairement établie par son observation chez des individus naïfs de tout TAR en comparaison à des individus séronégatifs^{262-264,268,270,272,274,276}. Des expériences *in vitro* ont en ce sens permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs protéines virales telles que Tat (de l'anglais *trans activator of transcription*), Vpr (de l'anglais *viral protein r*) ou gp120 (de l'anglais *glycoprotein 120*) dans cette altération du nombre de copies, notamment par la modification du potentiel de membrane, par la suppression de la défense antioxydante ou bien encore par la production d'ERO pouvant affecter l'intégrité de l'ADNmt^{261,277-284}. L'accumulation de mutations et la présence de délétions dans cet ADN ont d'ailleurs été rapportées chez les PLWH²⁸⁵⁻²⁸⁹. D'un point de vue fonctionnel, une diminution de l'activité des complexes enzymatiques de la CRM a également été observée chez ces individus^{265,267,268,272,276,290}.

L'observation d'une déplétion de l'ADNmt entre les PLWH recevant un TAR et ceux naïfs de tout traitement suggère la contribution des ARV dans cette toxicité mitochondriale^{262,290-293}. Plusieurs études ont d'ailleurs montré une réversion de cette déplétion suite à l'arrêt du TAR ou un changement de régime ARV²⁹⁴⁻²⁹⁸. L'utilisation des ARV resterait toutefois bénéfique, notamment lors de la mise sous traitement des PLWH ne recevant pas encore de TAR²⁶³.

2.2. Mécanisme de la toxicité mitochondriale liée à l'utilisation des antirétroviraux

En l'état actuel des connaissances, trois classes d'ARV semblent être associées à l'émergence de dysfonctions mitochondriales chez les PLWH : les INTI, INNTI et les IP.

Les INTI sont particulièrement bien connus pour leur toxicité mitochondriale *in vitro*²⁹⁹⁻³⁰¹. La déplétion de l'ADNmt y est fréquemment décrite, notamment avec l'utilisation de l'AZT, de la didanosine et de la stavudine³⁰²⁻³⁰⁵. Les INTI entrent en compétition avec les désoxyribonucléotides triphosphates lors de la réplication de l'ADNmt. Etant dépourvus d'une extrémité 3'OH libre sur le désoxyribose, ces ARV agissent en tant que terminateurs de chaîne lors de la réplication de l'ADNmt en empêchant la formation du pont phosphodiester nécessaire à l'ajout du nucléotide suivant sur le brin d'ADN en cours d'élongation (**Figure 3.6**)^{299,306}. Ils peuvent par ailleurs agir par inhibition directe de l'ADN polymérase γ , enzyme clé de la réplication de l'ADNmt^{299,306}. Les INTI n'ont cependant pas tous le même potentiel inhibiteur sur cette enzyme. Des études *in vitro* ont permis d'établir un classement croissant selon le degré d'inhibition propre à chacun : zalcitabine \geq didanosine \geq stavudine \gg lamivudine $>$ ténofovir $>$ emtricitabine \geq zidovudine $>$ abacavir^{299,306}. *In fine*, les deux mécanismes d'actions des INTI conduisent à une cascade d'événements affectant le fonctionnement de la mitochondrie : diminution du nombre de copies (déplétion), dysfonctionnement de la CRM, production d'ERO endommageant l'ADN et favorisant l'apparition de mutations et de délétions (**Figure 3.6**)^{299,306}. Outre leur effet sur le nombre de copies d'ADNmt, les INTI sont également capables d'induire de façon directe un stress oxydatif et la production d'ERO *in vitro*³⁰⁷⁻³¹¹.

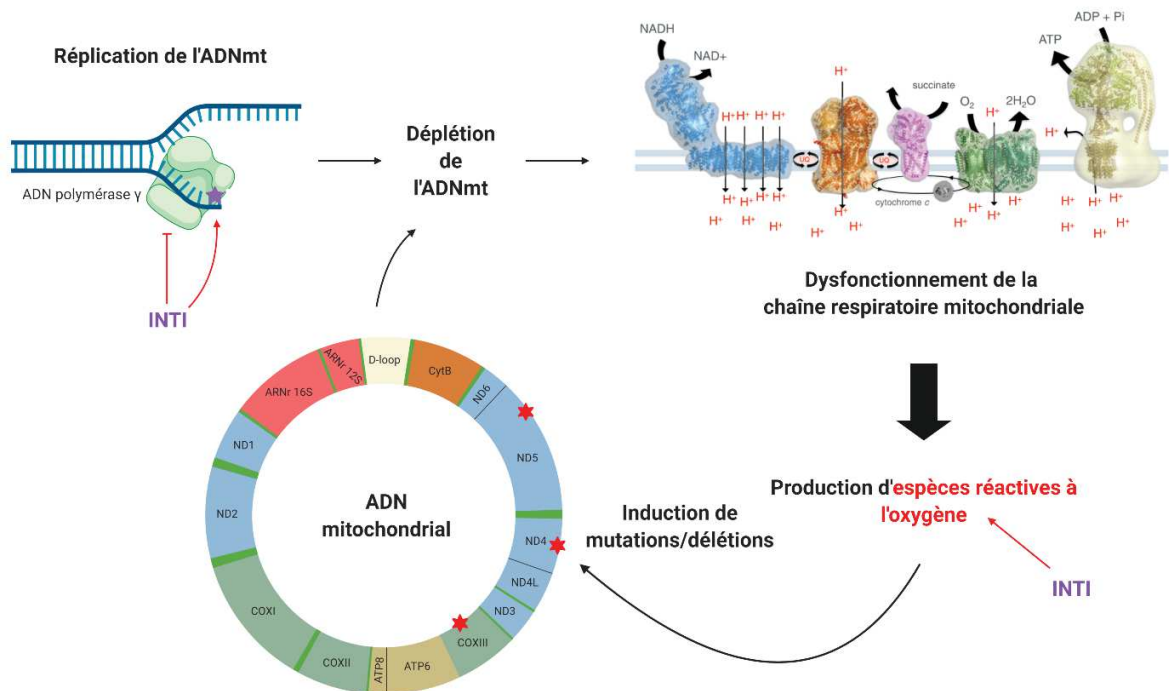


Figure 3.6. Mécanismes des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) dans la génération de la toxicité mitochondriale. Abréviations : ADN, acide désoxyribonucléiques ; ADNmt, ADN mitochondrial ; INTI, inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse. Illustration créée sur Biorender.com.

Deux représentants de la classe des INNTI, l'EFV et la NVP, ont également révélé leur potentiel toxique sur la mitochondrie lors d'études *in vitro* menées sur des cellules primaires hépatocytaires, neuronales et astrocytaires humaines, mais également chez le modèle murin. Ces travaux ont ainsi montré l'inhibition directe du complexes I de la chaîne respiratoire mitochondriale par l'EFV³¹²⁻³¹⁴, ainsi que la diminution du potentiel de membrane³¹³⁻³¹⁷, la génération de stress oxydatif et la production d'ERO^{313,314,316,318,319}. Une déplétion de l'ADNmt conséquente à ces événements a également été observée³²⁰. La NVP induit quant à elle la mort des cellules par apoptose via la voie extrinsèque mitochondriale^{321,322}, phénomène également rapporté pour l'EFV³²⁰.

Les études évaluant la toxicité mitochondriale liée à l'utilisation des IP rapportent la perte du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules mononuclées du sang périphériques (PBMC, de l'anglais *peripheral blood mononuclear cells*) de personnes non infectées et traitées par le saquinavir et l'indinavir *ex vivo*, ainsi que l'induction de l'apoptose médiée par la mitochondrie³²³. Le ritonavir et le lopinavir sont également impliqués dans cette mort cellulaire^{324,325}. Ces derniers ainsi que le nelfinavir et l'atazanavir, peuvent également induire un stress oxydatif et la production d'ERO³²⁴⁻³²⁹.

2.3. Toxicité mitochondriale chez les enfants exposés au VIH non infectés

En 1999, l'équipe de Stéphane Blanche (Hôpital Necker, Paris) décrit pour la première fois un tableau clinique associé à d'importants symptômes neurologiques et/ou des anomalies biologiques compatible avec une dysfonction mitochondriale chez des CHEU exposés *in utero* et en périnatal à l'AZT ou à la combinaison AZT+3TC ; deux de ces enfants décédant à l'âge d'environ 1 an³³⁰. Dès lors, l'évaluation de la toxicité mitochondriale liée à l'utilisation des ARV pendant la grossesse ou en postnatal, et plus particulièrement des INTI, a suscité un intérêt majeur et fait l'objet d'une attention grandissante. Plusieurs autres cas de dysfonctions mitochondriales avérées ou suspectées ont ultérieurement été rapportés, les enfants présentant entre autres des épisodes d'hyperlactatémie sévère, des crises d'épilepsie, des atteintes motrices et un retard du développement neurocognitif^{331,332}. L'une de ces études, incluant une cohorte de plus de 2600 CHEU, a notamment rapporté une incidence de dysfonction mitochondriale à 18 mois de 0.26% contre 0.01% observée dans la population générale pédiatrique³³¹.

Si ces manifestations cliniques de dysfonction mitochondriale restent rares, des atteintes cellulaires et moléculaires existent et ont d'ailleurs été rapportées chez des CHEU asymptomatiques. Des altérations de l'ultrastructure de la mitochondrie incluant leur gonflement, la rupture des membranes, la désorganisation de crêtes mitochondriales ainsi que la perte du matériel matriciel ont notamment été observées par microscopie électronique dans des cellules endothéliales du cordon ombilical de CHEU exposés *in utero* à la combinaison AZT+3TC ou AZT+ddl^{333,334}. D'autres études ont également décrit une diminution de l'activité des complexes enzymatiques de la CRM dans plusieurs types cellulaires (PBMC, CBMC, lymphocytes)^{331,335,336}, tissus (muscles squelettiques)^{330,331} et organes (foie, cœur)^{330,331} chez les CHEU exposés *in utero* à l'association AZT+3TC ou à des combinaisons d'ARV incluant une base INTI en comparaison à des CHUU. Une étude a néanmoins montré des niveaux similaires d'activités de ces complexes dans les PBMC à la naissance entre ces deux groupes d'enfants³³⁷.

La quantification de l'ADNmt a par ailleurs fait l'objet de nombreuses études transversales rapportant des résultats contradictoires. La **Table 3.1** résume la littérature sur le nombre de copies d'ADNmt entre les CHEU et les CHUU. La plupart de ces travaux ont observé une déplétion de l'ADNmt dans le sang à la naissance chez les CHEU exposés *in utero* aux ARV en comparaison à des CHUU^{333-335,338,339}, mais également chez des CHEU plus âgés, entre 6 semaines et 2 ans^{336,338-340}. Une normalisation de la quantité d'ADNmt à un taux semblable à celui observé chez les CHUU a toutefois été observée à 5 ans chez une minorité d'enfants ayant pu être suivis aussi tardivement³³⁹. Les quelques autres études longitudinales portant sur les CHEU décrivent là encore des résultats discordants avec l'observation d'une faible augmentation du nombre de copies à 2 ans³³⁸, ou une cinétique biphasique décrivant une stabilisation du contenu mitochondrial entre la naissance et 6 mois puis entre 2 ans et 3 ans, entrecoupée par une diminution progressive de la quantité d'ADNmt³⁴¹. A l'inverse, un nombre de copies d'ADNmt plus élevé chez des CHEU à la naissance^{337,341-344}, au cours de la première année de vie³⁴², à l'âge de 3 ans³⁴¹, ou 6 ans par rapport aux CHUU a également été rapporté³⁴⁵. Une hypothèse émise pour expliquer cette discordance entre les études impliquerait un mécanisme compensatoire en réponse au stress oxydatif induit par l'exposition au VIH et aux ARV, passant notamment via une augmentation de la biogenèse mitochondriale. Quelques études ont en ce sens observées une augmentation du nombre de mitochondries dans les PBMC³³⁶ ou les cellules du cordon ombilical³³³ de CHEU exposés *in utero* aux ARV et/ou en périnatal en comparaison à des CHUU.

L'observation concomitante de ce phénomène avec la corrélation entre la durée d'exposition et le degré des dommages mitochondriaux supporte également cette hypothèse³³³.

L'association entre l'exposition aux ARV pendant la grossesse et la quantité d'ADNmt est démontrée par la comparaison entre les CHEU exposés aux ARV *in utero* et ceux nés de mères n'ayant pas reçus de TAR^{338,339,343}. La quantité d'ADNmt chez les CHEU, qu'elle soit inférieure ou supérieure à celle observée chez les CHUU, ne semble pas être associée ni corrélée avec le type de régime ARV pris pendant la grossesse (monothérapie, bithérapie ou combinaison ARV (cART))^{336,339}, le type de cART^{335,341} ou la durée d'exposition *in utero* au TAR maternel^{336,339,341,342,344}. D'autres facteurs ont cependant montré une association avec le taux d'ADNmt : faible âge gestationnel à la naissance, prématurité, et tabagisme pendant la grossesse³⁴¹. Par ailleurs, l'utilisation d'une prophylaxie ARV à base d'AZT sur le court terme ne semble pas non plus affecter le nombre de copies d'ADNmt chez les CHEU entre la naissance et 6 semaines de vie³⁴¹ mais serait associée à un nombre de copies d'ADNmt moindre comparé à une prophylaxie employant de la NVP chez des enfants âgés de 6 semaines³⁴⁰.

Si l'aspect quantitatif de l'ADNmt est largement décrit dans la littérature, l'aspect qualitatif reste toutefois très peu exploré chez les CHEU. Son importance n'est cependant pas moindre puisque, nous l'avons vu précédemment, tout dysfonctionnement de la CRM conduit à la production d'ERO pouvant induire des mutations et *in fine* être associé à l'émergence de mitochondriopathies. Certains cas de dysfonctions mitochondriales historiquement décrits présentent d'ailleurs des symptômes semblables au syndrome de Leigh, maladie mitochondriale caractérisée entre autre par des mutations ponctuelles et par insertion de l'ADNmt^{330,331}. Si une étude a détecté la présence de la mutation par transition AT/GC chez les CHEU, elle n'a cependant pas mis en évidence de différence avec la fréquence de mutations observée chez les CHUU³⁴⁶. Par ailleurs, deux autres études ont recherché la présence de délétions (multiples, simples ou délétion commune $\Delta 4977$), toutes deux ne décelant aucune d'entre elles dans les PBMC d'enfants de 18 mois exposés *in utero* à l'AZT, au 3TC ou à la combinaison AZT+3TC et en périnatal à l'AZT³⁴⁷, ou dans les cellules veineuses du cordon ombilical de nouveau-nés exposés *in utero* à l'AZT³⁴⁴. La recherche de ces mutations au sens large ne fait cependant pas l'objet d'une analyse exhaustive et repose sur des techniques manquant de sensibilité ne permettant pas une analyse approfondie visant la caractérisation d'éventuels variants pathogènes et l'identification de la nature des délétions. Par ailleurs à ce jour, aucune étude longitudinale sur l'évolution des délétions n'a été conduite chez les CHEU.

Cette question reste cependant cruciale car, contrairement au nombre de copies d'ADNmt qui peut se voir inverser suite à l'arrêt de l'exposition aux ARV, les délétions elles ne peuvent pas être réparées et s'accumulent avec l'âge³⁴⁸, posant des interrogations sur leur(s) conséquence(s) clinique(s) chez les CHEU.

Statut	n	Age	Pays	Exposition	Cellules	Nombre de copies d'ADNmt CHEU versus CHUU	Références
CHUU	9-11	Naissance 1 an 2 ans	Etats-Unis	-	Leucocytes du cordon ombilical et leucocytes périphériques	CHEU AZT+ < CHEU AZT- < CHUU Naissance : 67% déplétion 1 an : 65% déplétion 2 ans : 58% déplétion Augmentation du nombre de copies au cours des deux premières années	338
CHEU	10			<i>In utero</i> : pas d'exposition aux ARV			
CHEU	10			<i>In utero</i> : AZT			
CHUU	9	Naissance	Etats-Unis	-	CBMC et Cellules endothéliales du cordon ombilical	CBMC : 37.7% déplétion Cellules du cordon : 36.9% déplétion	333
CHEU	10			<i>In utero</i> : AZT+3TC			
CHUU	209	6 semaines	Cameroun	-	Sang total (DBS)	Déplétion CHEU AZT < CHEU NVP	340
CHEU	117			<i>In utero</i> : AZT ou cART (basée sur INNTI) Prophylaxie postnatale : NVP			
CHEU	38			<i>In utero</i> : AZT ou cART (basée sur INNTI) Prophylaxie postnatale : AZT			
CHUU	411	Naissance	Etats-Unis	-	PBMC	Naissance et 2 ans : déplétion Normalisation à 5 ans pour CHEU exposés <i>in utero</i> aux ARV mais déplétion persistante pour ceux non exposés aux ARV	339
CHEU	71- 25	Naissance, 2 ans, 5 ans		<i>In utero</i> : pas d'exposition aux ARV			
CHEU	71-9			<i>In utero</i> : AZT ou AZT+3TC			
CHUU	50	< 2 jours	Etats-Unis	-	PBMC	CHEU > CHUU	349
CHEU	85			<i>In utero</i> : AZT et 3TC majoritairement et IP			
CHUU	20	< 2 jours	Etats-Unis	-	CBMC et PBMC	CBMC : CHEU = CHUU PBMC : CHEU > CHUU	343
CHEU	26			<i>In utero</i> : AZT, AZT+3TC+RTV, AZT+3TC+LPV/r			

Statut	n	Age	Pays	Exposition	Cellules	Nombre de copies d'ADNmt CHEU versus CHUU	Références
CHUU	86-214	Naissance à 3 ans	Canada	-	Sang total	CHEU > CHUU au cours des trois premières années	341
CHEU	114-214			<i>In utero</i> : AZT+3TC+LPVr/NEF/NVP Prophylaxie postnatale : AZT 6 semaines			
CHUU	7	Naissance	Etats-Unis	-	Leucocytes et cellules endothéliales du cordon ombilical	Leucocytes : 36% déplétion Cellules endothéliales : 31% déplétion	334
CHEU	11			<i>In utero</i> : AZT+3TC ou AZT+ddl			
CHUU	73	Naissance, 3 mois, 6 mois, 1 an	Espagne	<i>In utero</i> : AZT, 3TC et d4T majoritairement Prophylaxie postnatale : AZT (4-6 semaines)	PBMC	CHEU = CHUU aux 4 temps (tendance vers une diminution)	336
CHEU	133						
CHUU	35	Naissance	Espagne	-	CBMC	38.6% déplétion	336
CHEU	27			<i>In utero</i> : 2 INTI + IP/INNTI			
CHUU	53	Naissance	Tanzanie	-	Cellules endothéliales du cordon ombilical	CHEU > CHUU	344
CHEU	30			<i>In utero</i> : AZT			
CHUU	81	<3jours, 4 jours, 6 semaines, 4 mois et 8 mois	Canada	-	Sang total	< 3 jours : CHEU=CHUU CHEU > CHUU pour les périodes de 4 jours à 6 semaines, de 6 semaines à 16 semaines et de 16 semaines à huit mois	342
CHEU	73			<i>In utero</i> : AZT+3TC+IP/INNTI majoritairement Prophylaxie postnatale : AZT (6 semaines)			
CHUU	91	6 ans	Canada	-	Sang total	CHEU > CHUU	345
CHEU	56			<i>In utero</i> : AZT+3TC+IP/INNTI Prophylaxie postnatale : AZT (6 semaines)			

Table 3.1 Revue de la littérature relative la quantité d'ADNmt rapportée entre les CHEU et les CHUU

Peu de temps après l'identification des premiers cas de dysfonction mitochondriale chez les CHEU, des études menées chez le singe *Erythrocebus Patas* ont permis de mettre en évidence de façon indépendante l'effet délétère des ARV chez des nouveau-nés primates. Ces singes constituent un modèle de choix pour l'étude de l'effet des ARV car d'une part, ils ne sont pas susceptibles à l'infection par le VIH et d'autre part, la placentation et la pharmacocinétique des ARV sont semblables à celles observées chez l'Homme³⁵⁰. Les études menées chez ce modèle primate portent uniquement sur des INTI utilisés à des doses mimant celles utilisées en clinique humaine. Les affectations mitochondriales chez les nouveau-nés exposés aux INTI (mono-, bi-, trithérapie) au cours de la gestation font échos à celles observées chez les CHEU. Ces travaux rapportent notamment à la naissance l'incorporation des ARV dans l'ADNmt^{351,352}, des altérations de la morphologie des mitochondries³⁵²⁻³⁵⁶, un dysfonctionnement de l'activité des complexes enzymatiques de la CRM^{354,355,357,358}, ainsi que la déplétion de l'ADNmt³⁵²⁻³⁵⁷. Contrairement aux CHEU dont l'analyse de la toxicité mitochondriale est restreinte au compartiment sanguin par souci d'éthique, les atteintes mitochondriales rapportées chez le singe ont quant à elles été également observées dans de multiples tissus et organes (muscles squelettiques, foie, reins, placenta, cœur, cerveau). L'observation d'une persistance de la déplétion mitochondriale et des dommages structuraux à un et 3 ans dans les muscles, le cœur et le cerveau chez ces singes est inquiétante pour leur transposition chez les CHEU ; un singe *Erythrocebus Patas* âgé de 3 ans étant équivalent à un adolescent de 15 ans³⁵⁹. Comme mentionné précédemment, les manifestations cliniques des dysfonctions mitochondriales observées chez les CHEU sont peu fréquentes. L'implication des altérations de l'ADNmt en relation avec l'exposition aux ARV que nous venons de décrire y est fortement suspectée sans lien de causalité avéré et souligne la nécessité d'une évaluation à plus long terme de cette toxicité mitochondriale, en particulier sur le développement neurocognitif et sur la croissance des CHEU.

II. Toxicité génomique des antirétroviraux : impact sur la longueur des télomères

1. Généralités sur les télomères

1.1. *Historique, structure et fonction*

Les chromosomes, porteurs de l'information génétique au sein du noyau cellulaire des Eucaryotes, possèdent à leurs extrémités des répétitions de séquences d'ADN non codantes, répétées en tandem, et hautement conservées appelées télomères (du grec *telos* signifiant « fin » et *meros* signifiant « partie »)^{360,361}. Identifiés pour la première fois en 1938 par Hermann Müller chez la mouche *Drosophila melanogaster*, puis en 1941 dans le maïs *Zea mays* par Barbara McClintock³⁶², les télomères ont pour fonction de maintenir la stabilité du génome nucléaire en empêchant la fusion des chromosomes par leurs extrémités et la dégradation du matériel génétique^{362,363}.

La composition nucléotidique des séquences répétées et la longueur des télomères sont variables d'une espèce à l'autre³⁶⁰. Elizabeth Blackburn fut la première à caractériser la séquence télomérique 5'-(CCCCAA)-3' chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* en 1978³⁶⁴. Chez l'Homme, ce sont les travaux de Robert Moyzis menés en 1988 qui ont permis de mettre en évidence la répétition de la séquence hexamérique enrichie en guanine, 5'-(TTAGGG)-3'³⁶⁵, hautement conservée chez plus de 90 espèces vertébrées incluant les Mammifères^{366,367}. La longueur des télomères chez l'Homme varie typiquement de 10 à 15 kb³⁶⁸. En amont des télomères se trouvent des régions particulières séparant les séquences chromosomiques des répétitions télomériques (**Figure 3.7**). Ces régions dites subtélomériques varient de 10 et 500 kb et sont constituées de répétitions de séquences hétérogènes qui ne sont pas conservées entre les espèces³⁶⁹. Ces subtélomères comportent de nombreux réarrangements chromosomiques, en particulier des répétitions télomériques dégénérées ainsi que des duplications segmentaires³⁶⁹. Les fonctions de ces structures sont encore assez peu décrites mais elles interféreraient avec les fonctions des télomères^{370,371}.

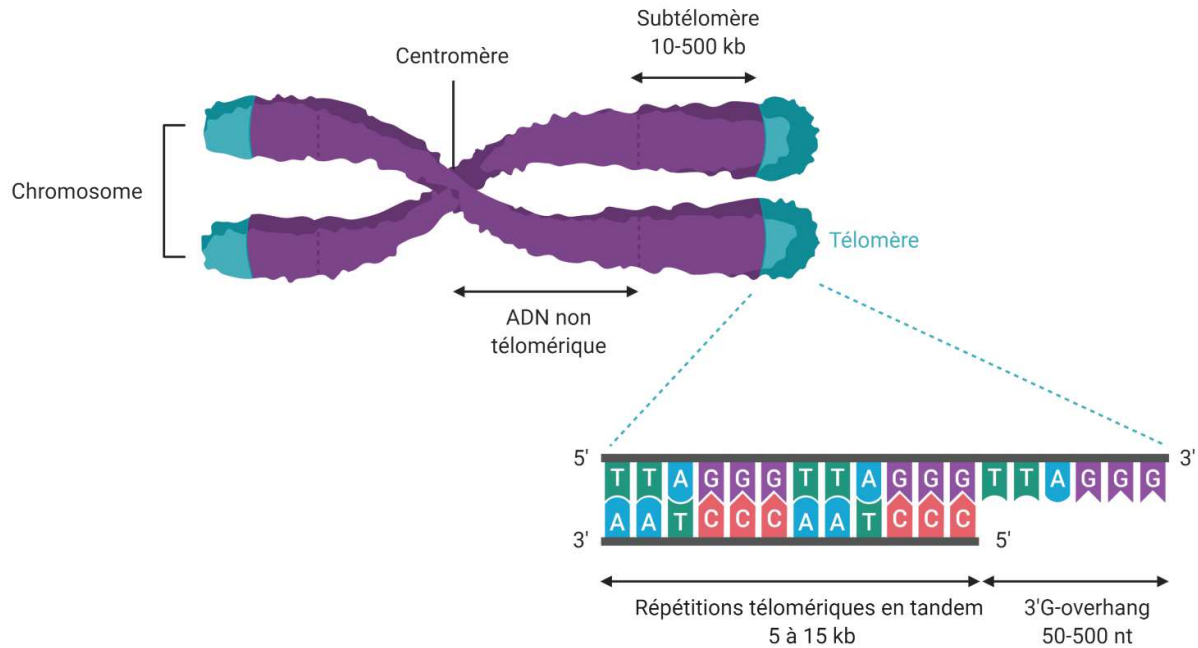
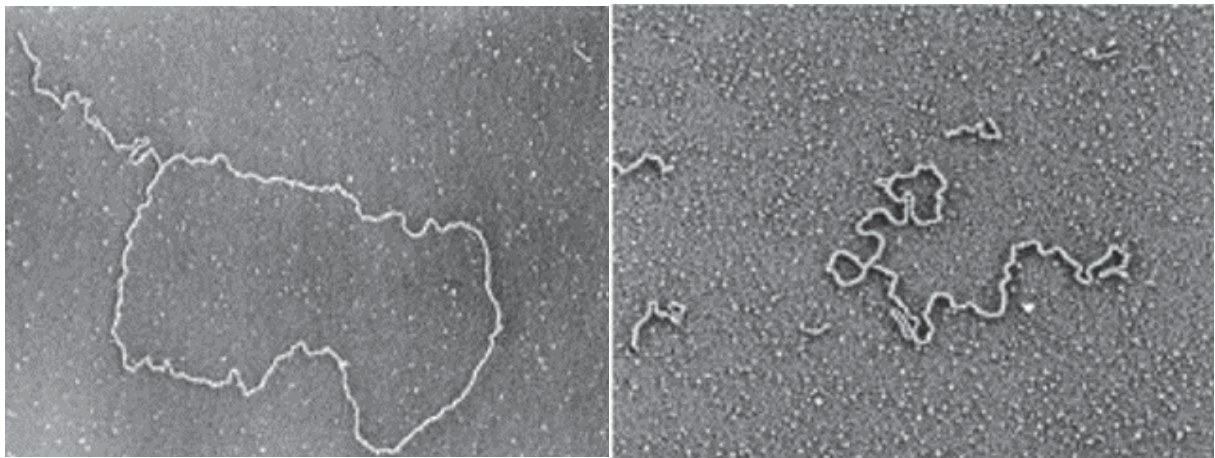


Figure 3.7. Organisation architecturale d'un chromosome et structure de l'ADN télomérique. Abréviations : ADN, acide désoxyribonucléique ; kb, kilobase ; nt, nucléotides. Illustration créée sur Biorender.com.

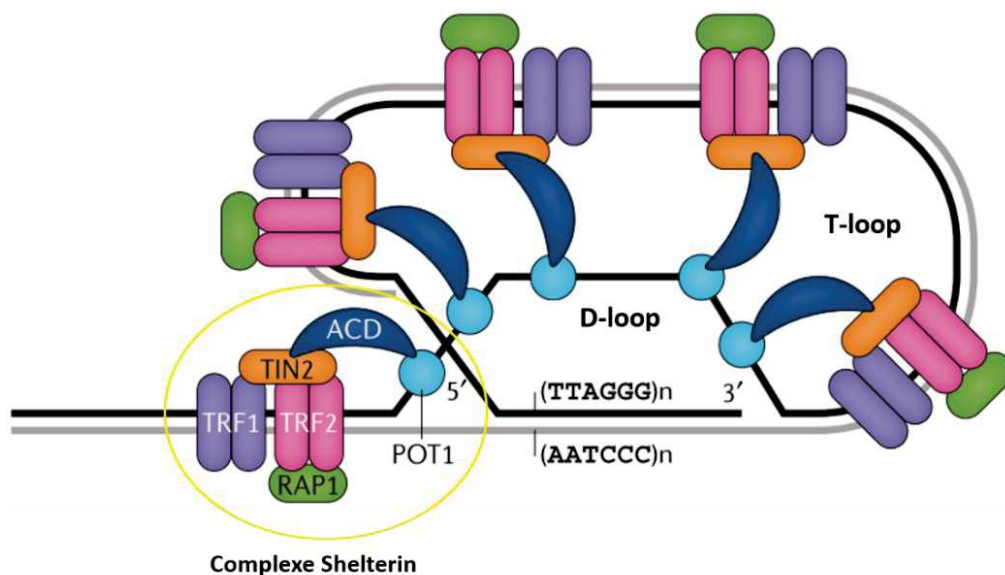
La structure des télomères est étroitement liée à leur fonction. Les télomères possèdent une région d'ADN double brin et une extrémité 3' simple brin appelée 3'G-overhang étendue sur environ 200 nucléotides^{372,373} (**Figure 3.7**). Cette particularité structurale, qui s'apparente à une cassure d'ADN double brin, n'est cependant pas reconnue par les mécanismes de réparation cellulaire de l'ADN intervenant habituellement de façon physiologique en réponse à des dommages à l'ADN. Elle confère au contraire aux télomères la capacité d'adopter plusieurs conformations spécifiques. Parmi les plus connues, la structure « en lasso », dite T-loop^{374,375} ou en G-quadruplex^{376,377} (**Figure 3.8**) sont particulièrement bien décrites et permettent de masquer l'extrémité 3' libre empêchant ainsi toute reconnaissance et recombinaison des deux brins chromosomiques par le système de recombinaison homologue ou par celui de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, de l'anglais *non-homologous end-joining*)³⁷⁸. La structure en T-loop, initialement observée en microscopie électronique par Jack Griffith en 1999³⁷⁴, comporte en réalité deux boucles : la T-loop correspond au repliement de l'ADN télomérique double brin sur lui-même alors que l'extrémité 3'G-overhang vient envahir et s'hybrider sur le brin d'ADN au sein de la D-loop nouvellement formée (**Figure 3.8 A et B**).

Six protéines constituant le complexe Shelterin, appelé aussi télosome, viennent s'associer à l'ADN télomérique sur sa partie double brin ou sur son extrémité 3' sortante afin de garantir la stabilité et la protection de la T-loop^{378,379}. La richesse en guanine des séquences télomériques permet également à l'extrémité 3'G-overhang d'adopter une conformation en G-quadruplex (Figure 3.8 C), que l'on peut aussi retrouver au sein de la D-loop en tant que stabilisateur. D'autres conformations ont été plus récemment décrites mais ne feront pas l'objet d'une description dans cette thèse³⁷⁰.

A



B



C

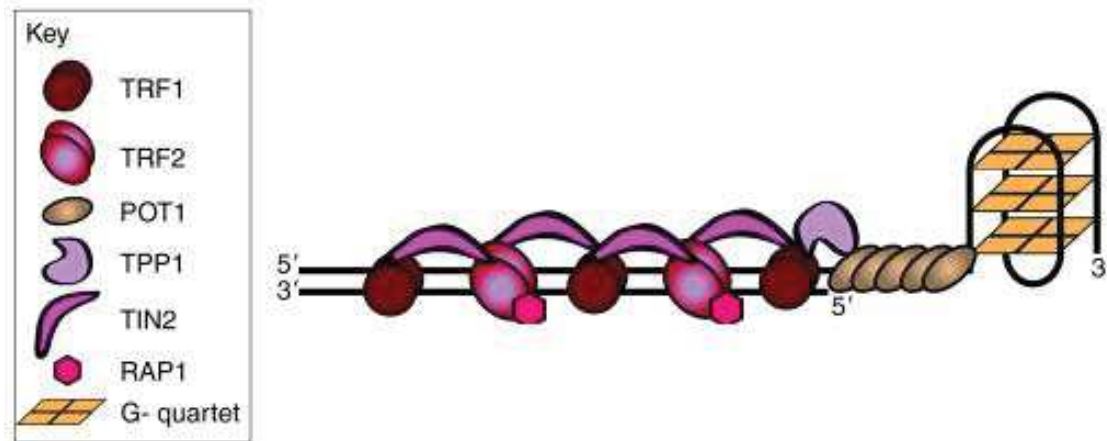


Figure 3.8. Conformations en T-loop et G-quadruplex des télomères. (A) Structure T-loop observée *in vitro* par microscopie électronique dans des extraits de cellules Hela (gauche) et de lymphocytes humains du sang périphérique (droite). Source : Griffith et al., 1999³⁷⁴. (B) Représentation schématique de la structure en T-loop. Source : modifié d'après Shay et al., 2019³⁸³. (C) Représentation schématique de la structure G-quadruplexe. Source : modifié d'après Organesian et al., 2009³⁸⁰. Abréviations : TRF1, Telomere Repeat binding Factor 1 ; TRF2, Telomere Repeat binding Factor 2; RAP1, Repressor/Activator Protein 1; POT1, Protection of Telomere 1; TIN2, TRF-1 and TRF-2 Interacting Nuclear protein 2; TPP1 ou ACD, Telomere Protection Protein 1.

1.2. Raccourcissement des télomères

1.2.1. Le problème de fin de réplication des chromosomes

Chez les Eucaryotes, chaque division cellulaire conduit à une perte d'information génétique en raison dudit «problème de fin de réplication des chromosomes», mis en évidence indépendamment par James Watson et par Alekseï Olovnikov au début des années 1970^{381,382} (**Figure 3.9**). La nature antiparallèle des deux brins d'ADN couplée à l'activité unidirectionnelle des ADN polymérases dans le sens 5' vers 3' oblige une réplication bidirectionnelle au niveau de la fourche de réplication. Si la réplication du brin 5'-3' (de l'anglais *leading strand*) s'effectue de façon continue, celle du brin 3'-5' (de l'anglais *lagging strand*) procède de façon discontinue par l'intermédiaire de plusieurs fragments d'environ 200 nucléotides appelés fragments d'Okazaki.

Ces derniers sont initiés par de courtes amorces ARN synthétisées par la primase qui seront éliminées avant l'étape finale de ligation des fragments par la ligase. L'élimination de l'amorce à proximité de l'extrémité 5' du brin néoformé couplée à une maturation post-répllicative de l'extrémité 5' du néobrin issu de la répllication du brin avancé entraînent ainsi un raccourcissement des télomères d'environ 50 à 200 paires de bases à chaque cycle répllicatif.

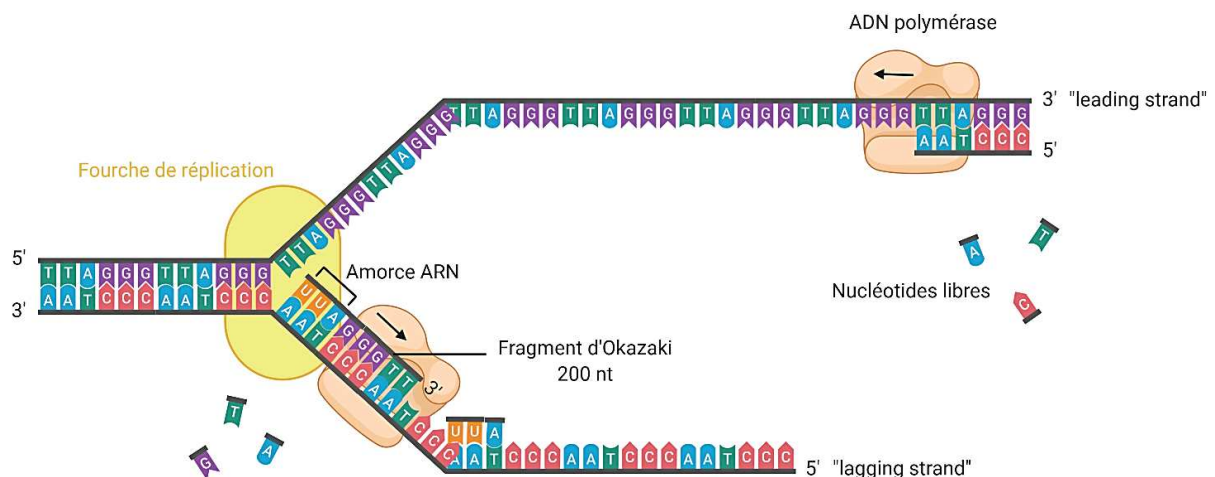


Figure 3.9. Problème de fin de répllication des chromosomes chez les Eucaryotes.
Abréviations : ADN, acide désoxyribonucléique ; ARN, acide ribonucléique ; nt, nucléotides.
Illustration créée sur Biorender.com.

En 1965, Leonard Hayflick découvrit un seuil critique de division cellulaire (environ 50 divisions), qu'il appela « Limite de Hayflick », au-delà duquel la cellule cesse de façon irréversible son activité mitotique et entre en senescence répllicative, la conduisant de ce fait à l'apoptose³⁸³. En 1973, Alekseï Olovnikov établit un lien entre cette limitation de la capacité proliférative des cellules en culture et le problème de fin de répllication des chromosomes mis en évidence par James Watson un an auparavant. La longueur des télomères incarne ainsi une « horloge moléculaire », leur raccourcissement reflétant l'historique du nombre de répllications d'une cellule.

1.2.2. Télomérase

Sept ans après la caractérisation des séquences répétées télomériques chez *Tetrahymena thermophila*, Elizabeth H. Blackburn fit une nouvelle découverte majeure, récompensée en 2009 par le Prix Nobel de Médecine, par la mise en évidence d'une ribonucléoprotéine capable de synthétiser ces répétitions télomériques chez ce même protozoaire : la télomérase³⁶⁴. Celle-ci sera identifiée quelques années plus tard, en 1989, par Gregg Morin dans des cellules humaines immortalisées³⁸⁴.

Chez l'Homme, la télomérase est constituée d'une sous-unité protéique appelée hTERT (de l'anglais, *human Telomerase Reverse Transcriptase*) et d'une sous-unité ARN appelée hTERC (de l'anglais *human Telomerase RNA Component*)^{380,385}. La sous-unité catalytique hTERT, par son activité ADN polymérase ARN dépendante (activité identique à celle des transcriptases inverses), catalyse l'ajout des séquences répétées 5'-TTAGGG-3' à l'extrémité 3'G-overhang des chromosomes en utilisant comme matrice ARN la sous-unité hTERC (**Figure 3.10**). Le brin 5' est quant à lui allongé par les ADN polymérases alpha et delta en utilisant le brin 3' comme matrice.

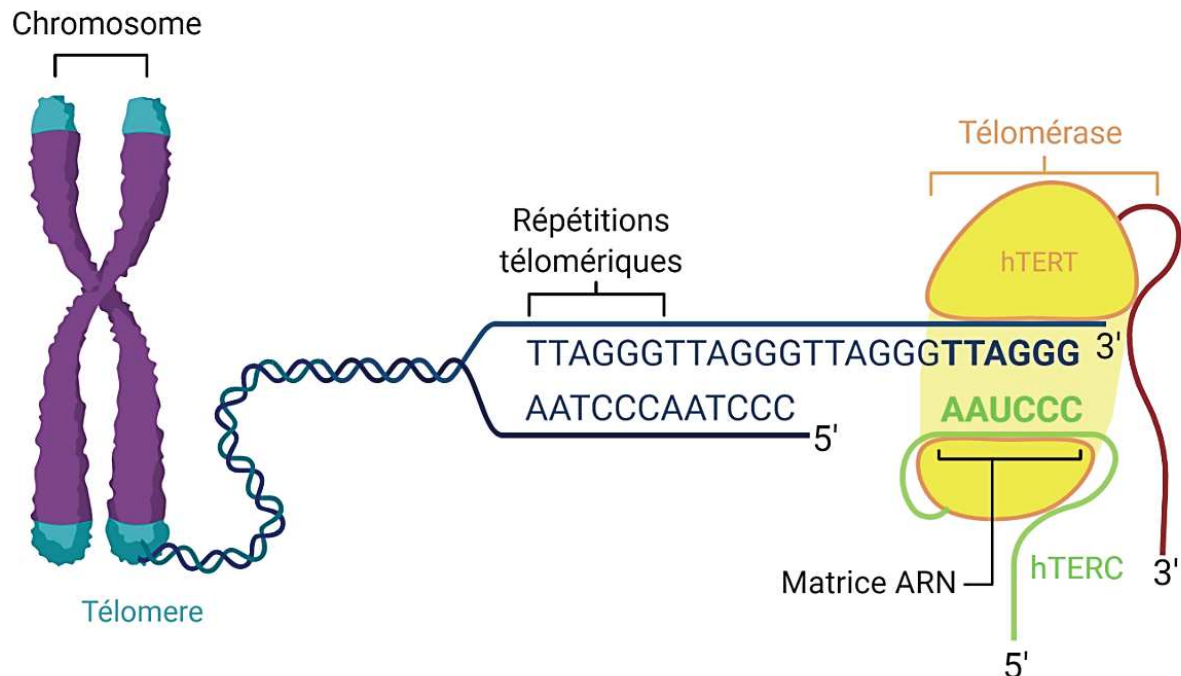


Figure 3.10. Extension de l'extrémité télomérique 3'G-overhang par la télomérase.

Illustration créée sur Biorender.com.

En 1986, Howard Cooke remarqua de façon surprenante que les télomères des chromosomes sexuels des cellules germinales chez l'Homme étaient plus longs que ceux des cellules somatiques³⁸⁶. Les télomères étant les garants de la stabilité du génome, il suggéra alors que la télomérase serait réprimée dans les cellules somatiques afin de limiter leur capacité proliférative et l'accumulation de mutations, conduisant à l'attrition progressive des télomères dans ces cellules. Cette répression de la télomérase, partielle ou totale, dans les cellules somatiques s'effectuerait bien avant la naissance, au cours même de l'embryogenèse au stade blastocyste. Si son expression transitoire a été détectée dans de nombreux tissus somatiques (foie, poumons, rate, reins, cœur, glandes surrénales, muscles, peau, testicules, ovaires, intestins) de la huitième semaine de grossesse à la vingt-et-unième, elle n'est cependant plus observable dans le cœur dès la douzième semaine, dans les reins dès la seizième semaine, ni dans les tissus postnataux de nouveau-nés de 2 mois et chez l'adulte^{387,388}. La poursuite des travaux sur la télomérase permit de confirmer son expression dans les cellules de la lignée germinale^{387,389} mais aussi de détecter son activité dans plusieurs autres types cellulaires à prolifération rapide comme les cellules souches embryonnaires^{387,389}, les cellules placentaires ou les cellules du chorion^{390,391}, les cellules endométriales³⁹², les cellules souches hématopoïétiques adultes³⁹³⁻³⁹⁶, les lymphocytes activés^{393,394,397-400}, les cellules intestinales⁴⁰¹, les cellules épidermiques⁴⁰² et dans la plupart des cellules cancéreuses humaines^{393,397,402-407}. Ces dernières peuvent également avoir recours à un mécanisme de maintenance des télomères indépendant de l'activité télomérase, nommé ALT pour *Alternative Lengthening of Telomeres*, impliquant des recombinaisons homologues intra- et inter-chromosomiques^{408,409}.

1.2.3. Cinétique d'attrition des télomères

Le raccourcissement de la longueur des télomères ne suit pas une dynamique constante au cours de la vie. Les études pionnières menées par les groupes de Frenck et al. et de Zeichner et al. ont permis de mettre en évidence une phase de décroissance particulièrement accrue, estimée à environ 250 paires de bases par an, de la naissance à 4 ans⁴¹⁰⁻⁴¹². Cette rapide attrition télomérique est expliquée par le renouvellement important des cellules souches hématopoïétiques chez les jeunes enfants, en particulier pendant le développement accéléré de leur système immunitaire. La décroissance se poursuit par la suite graduellement de façon plus modérée, d'environ 50 paires de bases par an^{410,412}. Deux études ont cependant observé la présence d'une phase de stabilisation entre 4 et 25-28 ans^{410,412}.

1.2.4. Conséquences du raccourcissement télomérique

Le raccourcissement de la longueur des télomères serait l'un des mécanismes clés à l'origine de nombreuses pathologies liées au vieillissement incluant notamment les maladies cardiovasculaires^{361,366,413}, les maladies neurodégénératives^{361,413,414}, des dysfonctions hépatiques ou rénales⁴¹⁵⁻⁴¹⁷, l'ostéoporose^{413,415}, le diabète⁴¹⁸ ou bien encore le cancer^{413,419}.

1.2.5. Facteurs influençant la taille des télomères

Si la longueur des télomères se raccourcit physiologiquement avec l'âge chronologique, des facteurs environnementaux, comportementaux, psychologiques et génétiques peuvent accélérer ce phénomène^{361,420} et sont résumés dans la **Table 3.2**.

Facteurs associés à un raccourcissement de la longueur des télomères	Commentaires	Références
Consommation de tabac	Augmentation du stress oxydatif	420–423
Consommation d'alcool		420,424–427
Consommation de drogues d'addiction (héroïne, cocaïne/crack, diazépam)		428–430
Obésité		361,420,431–433
Qualité de l'alimentation et quantité	Un régime riche en acides gras polyinsaturés en comparaison à un régime riche en fibres, oméga 3, vitamines E et C, bêta-carotène et pauvre en protéines	434
Sédentarité/faible activité physique		434–438
Exposition à des agents génotoxiques	hydrocarbures aromatiques polycycliques, toluène, benzène	434,439
Stress psychologique et social	Les glucocorticoïdes sécrétés par les glandes surrénales en réponse au stress diminuent le niveau d'antioxydants, augmentant le stress oxydatif et promouvant ainsi les dommages à l'ADN et le raccourcissement des télomères	434,440–443
Ethnie	Les populations noires présentent des télomères plus longs en comparaison aux populations blanches	444–448
Genre	Les garçons ont des télomères plus courts que les filles. Les estrogènes sont capables de stimuler la télomérase et d'avoir des propriétés anti-oxydantes	448–450
Variants génétiques	Polymorphismes nucléotidiques (SNP) associés à un raccourcissement télomérique	451–454
Infection à <i>Cytomégalo</i> virus		455

Table 3.2. Facteurs accélérant le raccourcissement des télomères.

2. Téломères dans le contexte VIH

Si l'utilisation des ARV a considérablement augmenté l'espérance de vie des PLWH, celles-ci présentent néanmoins un vieillissement prématuré et développent plus précocement des pathologies associées au vieillissement, en comparaison à la population générale⁴⁵⁶⁻⁴⁶⁰. Bien que les causes de ce vieillissement soient multifactorielles, il a été proposé que les téломères et la téломérase y joueraient un rôle prépondérant.

2.1. *Longueur des téломères et téломérase chez les personnes vivant avec le VIH*

Les PLWH présentent une longueur des téломères inférieure à celle observée chez les individus non infectés dans les PBMC ou les lymphocytes périphériques⁴⁶¹⁻⁴⁶⁹. Une étude a cependant rapporté l'absence de différence entre des enfants infectés et des CHUU⁴⁷⁰. Plusieurs études ont également rapporté une diminution significative voire une absence totale de l'activité téломérase dans les lymphocytes périphériques ou dans les cellules progénitrices hématopoïétiques de patients VIH^{471,472}. Le raccourcissement de la longueur des téломères observé chez des individus nouvellement infectés par le VIH peu de temps après leur séroconversion, comparé à des individus non infectés^{465,473,474}, suggère grandement la contribution du virus dans ce processus. L'activation chronique du système immunitaire, associée à une augmentation du stress oxydatif et à celle de l'inflammation, inhérente à l'infection par le VIH elle-même, serait en partie à l'origine de ce raccourcissement téломérique⁴⁷⁵⁻⁴⁷⁸. La modulation de l'activité téломérase par le virus contribuerait également à ce phénomène. Des expériences *in vitro* ont ainsi pu mettre en évidence une réduction de l'activité de la téломérase dans plusieurs types cellulaires, notamment dans des lymphocytes T CD4+ infectés par le VIH⁴⁷⁹⁻⁴⁸¹. Plusieurs protéines accessoires du VIH ont par ailleurs montré leur capacité inhibitrice sur l'activité transcriptase inverse de la téломérase. C'est notamment le cas de Vpr qui détournerait le complexe ubiquitine ligase E3 de l'hôte, notamment impliqué dans l'élimination des protéines cellulaires anormales ou surnuméraires, afin de promouvoir l'ubiquitination et ainsi la dégradation de la sous-unité catalytique TERT de la téломérase⁴¹³. Tat régulerait quant à elle négativement l'expression nucléaire de TERT dans les lymphocytes T CD4+, indépendamment de sa transcription en ARN messagers, et réduirait également l'activation et la phosphorylation de TERT en interférant avec la voie de signalisation cellulaire AKT impliquée entre autre dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire et la modification post-transcriptionnelle de TERT^{482,483}.

2.2. Effet des antirétroviraux sur les télomères et la télomérase

La transcriptase inverse de la télomérase (TERT) partage des similitudes de structure et de fonction avec la transcriptase inverse du VIH, conférant ainsi aux INTI la capacité d'inhiber TERT^{484,485}. Des études *in vitro* utilisant des lignées cellulaires cancéreuses ont en ce sens montré l'inhibition de TERT par plusieurs INTI^{463,486-488} ainsi qu'un raccourcissement de la longueur des télomères (**Table 3.3**). Toutefois, seul le ténofovir employé à une concentration reflétant la dose thérapeutique utilisée chez les PLWH traités a montré une action inhibitrice⁴⁶³. D'autre part, le mécanisme selon lequel les INTI exerceraient leur capacité inhibitrice en agissant comme terminateur de chaîne sur la télomérase est difficilement applicable aux deux analogues de la cytosine 3TC et au FTC, cette base ADN étant absente des répétitions télomériques chez les Eucaryotes, et qui ont tous deux montré leur potentiel inhibiteur *in vitro*⁴⁶³. Ces INTI exerceraient ainsi leur activité inhibitrice d'une façon alternative, notamment via l'inhibition de la prolifération cellulaire, hypothèse émise suite à quelques études conduites sur des cellules cancéreuses et sur des PBMC activés^{489,490}.

L'EFV et la NVP, deux INNTIs, ne semblent quant à eux pas inhiber l'activité télomérase *in vitro*⁴⁸⁷ (**Table 3.3**).

Les IP participeraient quant à eux au raccourcissement de la longueur des télomères via le mécanisme décrit pour la toxicité mitochondriale associée aux ARV, c'est-à-dire par production d'ERO endommageant cette fois-ci l'ADN télomérique.

Etude	Cellules / animaux	ARV	Inhibition de TERT	Raccourcissement des télomères	Références
<i>In vitro</i>	Hela	AZT	+	-	486
<i>In vitro</i>	HT29	AZT	+	+	488
<i>In vitro</i>	PBMC activés	3TC, ABC, TDF	+	+	463
		AZT, FTC	+	-	
<i>In vitro</i>	HEK 293	AZT, d4T, TFV, ddI, ABC	+	NR	487
	HT29	NVP, EFV	-	NR	
		AZT, d4T	NR	+	

Table 3.3. Effets des antirétroviraux sur l'activité transcriptase inverse de la télomérase et sur la longueur des télomères *in vitro*. Abréviation : NR, non réalisé.

Si le lien entre l'infection à VIH et la longueur des télomères chez les patients VIH est aujourd'hui bien établi, la contribution des ARV n'a cependant pas encore été clairement mise en évidence et serait même positive^{469,470,491}. Quelques études ont en effet montré une longueur des télomères plus importante chez des patients VIH sous traitement ARV que chez des patients naïfs de tout traitement. L'hypothèse émise serait que les ARV exerceraient leur potentiel bénéfique via la diminution de l'activation chronique du système immunitaire^{470,492}. D'autre part, si le ténofovir utilisé à dose thérapeutique s'avère être le plus puissant inhibiteur de l'activité télomérase *in vitro*^{463,493}, la traduction de son effet chez des patients VIH sous TAR contenant ou non du TDF n'a cependant pas été confirmée⁴⁹⁴. Enfin, une exposition sur le court terme aux INTI ne serait pas associée à des modifications de l'activité télomérase ni de la longueur des télomères chez des individus séronégatifs exposés au VIH et ayant reçu une courte prophylaxie post-exposition⁴⁶³.

2.3. Longueur des télomères chez les enfants exposés au VIH non infectés

Des études menées chez la souris et chez le modèle primate *Erythrocebus Patas* ont pu mettre en évidence un raccourcissement de la taille des télomères dans de multiples organes des nouveau-nés suite à l'exposition à l'AZT seul ou combiné au 3TC utilisés pendant la gestation^{351,495,496}. Ce raccourcissement de la longueur des télomères observé chez ces modèles animaux et chez les PLWH est également décrit chez les CHEU, bien que peu d'études soient actuellement disponibles sur cette population^{459,460}.

Les études conduites chez les CHEU décrivent une longueur des télomères similaires à celle observée chez des enfants nés de mères non infectées, que ce soit dès la naissance ou au cours des premières semaines de vie^{491,497,498}, ou bien encore plus tardivement vers l'âge de 2 ans^{470,492}. Une étude a cependant rapporté une tendance vers une taille plus petite des télomères chez des enfants exposés non infectés âgés de 6 ans comparé à des enfants non exposés⁴⁹⁹.

L'évolution de la longueur des télomères au cours de la vie semble également être similaire entre les CHEU et les CHUU. Trois études incluant des cohortes d'enfants de tout âge, allant de la naissance à 3 ans⁴⁹⁸, 5 ans⁴⁹² ou 15 ans⁴⁷⁰ ont montré une diminution équivalente de la taille des télomères avec l'âge entre ces deux groupes de population. Ces trois études ne constituent cependant pas une réelle évaluation longitudinale chez des mêmes enfants, ne permettant ainsi pas de conclure quant à la dynamique des télomères chez ces enfants. Une seule étude a à ce jour rapporté une diminution rapide de la longueur des télomères au cours des 40 premières semaines de vie chez un suivi de 214 CHEU⁴⁹⁸.

Deux études américaines se sont attachées à comparer la taille des télomères entre les CHEU nés de mères infectées ayant reçu un TAR pendant la grossesse et ceux nés de mères infectées non traitées. Si l'une menée chez des enfants âgés de moins de 6 semaines ne montre pas d'association entre l'exposition aux ARV *in utero* (AZT seul ou combiné au 3TC ou au ddI, ou trithérapie) et un raccourcissement de la taille des télomères⁴⁹¹, la seconde décrit cependant une taille plus importante des télomères chez les enfants ayant été exposés à l'AZT maternel pendant la grossesse⁵⁰⁰. L'exposition postnatale à une prophylaxie ARV à base d'AZT sur le court terme, de la naissance à 6 semaines de vie, ne semble également pas impacter la taille des télomères^{492,498}.

D'autres facteurs de risque associés à un raccourcissement de la taille des télomères chez les enfants exposés au VIH non infectés ont également pu être mis en évidence au travers de ces études, et sont communs à ceux observés dans la population générale. On retrouve notamment l'âge et le genre de l'enfant (être de sexe masculin)⁴⁷⁰, l'ethnicité⁴⁹⁸, le jeune âge de la mère⁴⁷⁰ ou du père⁴⁷⁰ à la conception, la consommation de tabac^{491,498} ou de drogues d'addiction pendant la grossesse⁴⁹¹. Un faible poids à la naissance et être petit pour l'âge gestationnel seraient quant à eux associés à une longueur des télomères plus grande chez les enfants exposés non infectés comparé aux enfant non infectés⁴⁹⁸.

La **Table 3.4** résume la littérature sur la longueur des télomères entre les CHEU et les CHUU.

Statut	n	Age	Pays	Exposition	Cellules	Longueur des télomères CHEU versus CHUU	Références
CHUU	2	Naissance 1 an	Etats-Unis	-	CBMC et PBMC	CHEU = CHUU	497
CHEU	4			<i>In utero</i> : pas d'exposition aux ARV			
CHEU	3			<i>In utero</i> : AZT			
CHUU	104	10.6 ans	Canada	-	Leucocytes du sang périphérique	CHEU = CHUU	470
CHEU	177	1.7 ans		<i>In utero</i> : AZT ou AZT+3TC+IP/NVP ou ABC+3TC+IP/NVP ou ABC+3TC+NVP ou TDF+(FTC ou 3TC)+IP ou (d4T ou ddI)+3TC+IP ou autres combinaisons de 3 ou 4 ARV Prophylaxie postnatale : AZT ou AZT+3TC ou AZT+3TC+NFV ou ABC+3TC+NFV			
CHUU	43	< 7 jours	Canada	-	Leucocytes du sang périphérique	CHEU = CHUU	491
CHEU	56	< 7 jours		<i>In utero</i> : AZT+3TC+IP ou AZT+3TC+non-INTI ou autre			
CHEU	81	< 6 semaines		<i>In utero</i> : AZT ou AZT+3TC ou AZT+ddI ou trithérapie			
CHEU	39	< 6 semaines		-			
CHUU	56	1.9 ans	Espagne	-	PBMC	CHEU < CHUU	492
CHEU	65	1.7 ans		<i>In utero</i> : AZT+3TC+NVP ou AZT+3TC+IP ou TDF+FTC+IP Prophylaxie postnatale : AZT			

Statut	n	Age	Pays	Exposition	Cellules	Longueur des télomères CHEU versus CHUU	Références
CHUU	86	Naissance	Canada	-	Sang total	CHEU = CHUU	498
CHEU	114	Naissance		<i>In utero</i> : AZT+3TC+NVP ou AZT+3TC+NFV ou AZT+3TC+LPV/r ou AZT+3TC+IP/r ou autre Prophylaxie postnatale : AZT			
CHUU	25	6.9 ans	Afrique du Sud	-	Sang total	Tendance CHEU < CHUU	499
CHEU	33	6.1 ans		<i>In utero</i> : ARV recommandations actuelles Prophylaxie postnatale : AZT			

Table 3.4. Revue de la littérature relative à la longueur des télomères observée entre les CHEU et les CHUU.

Toutes ces études conduites chez les CHEU montrent néanmoins leurs limites par leur caractère uniquement transversal mais également par un faible échantillonnage^{491,492,497,499,500}, par une discordance dans les âges des populations d'enfants qui sont comparées^{470,492}, ou bien encore par la technique expérimentale employée (Southern blot versus PCR quantitative⁴⁹⁷). Le tabagisme pendant la grossesse et les différentes ethnies rapportées dans sont également des facteurs confondant affectant la longueur des télomères, dont l'effet est difficilement discernable de celui de l'exposition au(x) VIH/ARV.

III. Interconnexions entre mitochondries, télomérase et télomères

Les fonctions des mitochondries et des télomères ont souvent été étudiées de façon indépendante. Depuis quelques années cependant, une littérature grandissante met en lumière une relation étroite entre dysfonction mitochondriale et dysfonction télomérique, et inversement^{501,502}. Un aperçu de ces interconnexions est représenté en **Figure 3.11**.

Nous l'avons vu précédemment, le dysfonctionnement mitochondrial entraîne la production d'ERO endommageant l'ADNmt ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif via l'altération de l'activité de la CRM. Tous deux sont également à l'origine de dommages survenant dans l'ADN des télomères, conduisant au raccourcissement de ces derniers^{477,503-506}.

D'un autre côté, l'attrition télomérique engendre elle-même une dysfonction mitochondriale via l'implication de plusieurs voies de signalisation intracellulaires qui ne seront pas décrites en détail ici⁵⁰⁷⁻⁵¹⁰. L'une de ces voies implique notamment la suppression de l'expression d'une protéine régulant plusieurs fonctions mitochondriales incluant entre autre la réplication de l'ADNmt⁵⁰⁷. Par ailleurs hTERT, en dehors de son rôle canonique de maintenance de la longueur des télomères, possède également plusieurs fonctions extra-télomériques^{511,512}. En particulier dans des conditions de stress oxydatif, hTERT peut être importé dans la mitochondrie grâce à un signal d'adressage N-terminal^{513,514}, et exercer un rôle protecteur contre les ERO en inhibant directement celles-ci et en se liant à l'ADNmt, améliorant *in fine* l'activité de la CRM^{515,516}.

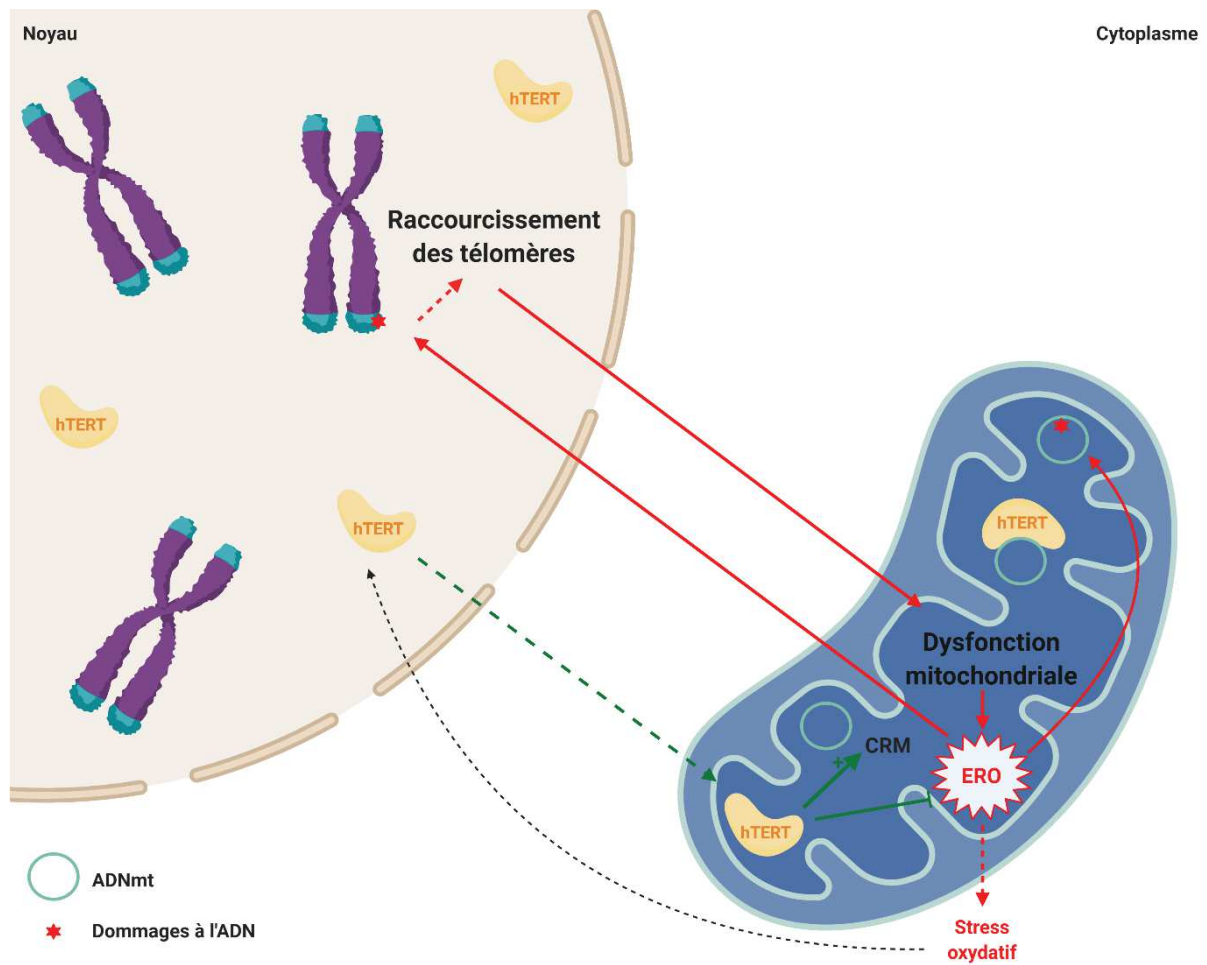


Figure 3.11. Interconnexions entre dysfonction mitochondriale et raccourcissement des télomères. Abréviations : *hTERT*, human telomerase reverse transcriptase ; *ERO*, espèces réactives à l'oxygène ; *CRM*, chaîne respiratoire mitochondriale ; *ADNmt*, ADN mitochondrial. Illustration réalisée sur Biorender.com.

Cette relation bidirectionnelle entre mitochondrie et télomère reste pour le moment très peu étudiée dans le contexte de l'infection à VIH. Il a néanmoins été proposé que la toxicité mitochondriale liée à l'utilisation des INTI serait due à l'inhibition de hTERT par ces derniers, hTERT n'exerçant ainsi plus des fonctions protectrices mitochondriales⁵¹⁷. En ce sens, une étude a pu observer chez des PLWH traités par ARV et présentant une dysfonction mitochondriale un mécanisme compensatoire passant par une augmentation de l'expression des ARNm de hTERT en réponse à une exposition aux ARV, en comparaison à des PLWH n'ayant pas de mitochondriopathies et à des individus séronégatifs⁵¹⁸. De récents travaux ont par ailleurs décrit une relation inverse entre la longueur des télomères et le nombre de copies d'ADNmt dans le sang total de femmes infectées par le VIH et traitées, soulignant que la préservation de la longueur des télomères se ferait au détriment du nombre de copies et inversement⁵¹⁹.

Objectifs de la thèse

Nous l'avons décrit tout au long de l'état de l'art, l'ère des ARV, aussi bénéfique soit-elle, a donné naissance à une population grandissante d'enfants non infectés nés de mères séropositives. Un million de CHEU naissent ainsi chaque année dans le monde. La santé fragile de ces enfants questionne en toute légitimité sur la nécessité d'identifier plus précocement ceux qui développeront des signes sub-cliniques ou cliniques et d'assurer leur suivi sur le long terme, ce dont ils ne bénéficient pas aujourd'hui. Ils ne constituent en effet ni une population clé (hommes homosexuels, injecteurs de drogues, prisonniers, travailleurs du sexe ou transgenres), ni une population vulnérable (adolescents, orphelins, personnes handicapées, migrants, travailleurs itinérants), comme définies par l'OMS. Les données épidémiologiques permettraient de les considérer comme une population à risque important d'acquisition du VIH (incidence supérieure à 3 pour 100 personne-années, OMS), tout du moins dans les pays à ressources limitées, mais cette notion n'est pas encore inscrite parmi les « decision-makers ».

Contrairement aux protocoles habituels d'autorisation de mise sur le marché des médicaments pédiatriques qui passent par l'évaluation de leur tolérance, efficacité et innocuité, la situation d'urgence à laquelle les CHEU sont confrontés a nécessité le déploiement rapide de prophylaxies ARV sans évaluation préalable de leur toxicité potentielle, pour protéger ces enfants de l'infection au VIH. Or, ces prophylaxies restent administrées à des enfants qui ne sont pas infectés. L'évaluation de la balance bénéfique/risque demeure donc cruciale pour leur santé.

L'exposition croissante des CHEU aux ARV interroge depuis de nombreuses années la communauté scientifique sur son lien potentiel avec leur santé et sur l'évolution de celle-ci au cours de leur vie. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte et ont consisté à évaluer l'innocuité de deux prophylaxies antirétrovirales, 3TC et LVP/r, administrées à des CHEU pendant leur première année de vie pour prévenir la transmission du VIH par l'allaitement. Si cette évaluation peut se faire à plusieurs niveaux, nous avons pour ce travail de thèse abordé la toxicité génomique de ces prophylaxies sur l'ADNmt et sur l'ADNn, toute altération de ces derniers pouvant engendrer des défauts systémiques et perdurer dans le temps.

L'**objectif principal** de cette thèse consiste ainsi à évaluer la génotoxicité du 3TC et du LPV/r sur l'ADNmt et l'ADNn et d'identifier les CHEU dont la santé se trouve impactée par ces ARV.

Cet objectif principal se décline en trois **objectifs secondaires** :

- (1) évaluer les altérations aiguës et sur long terme de l'ADNmt grâce au suivi longitudinal de CHEU de leur première année de vie jusqu'à l'âge de 6 ans.
- (2) évaluer l'altération aiguë et sur long terme de l'ADNn, et plus particulièrement de l'ADN télomérique, chez ces mêmes enfants.
- (3) rechercher une association entre les altérations génomiques et la santé des CHEU étudiés, à savoir leur impact sur leur croissance et leur développement neuro-psychomoteur.

Résultats

Article 1

« Mitochondrial DNA parameters in blood of infants receiving lopinavir/ritonavir or lamivudine prophylaxis to prevent breastfeeding transmission of HIV-1 »

Cette première partie fait état de la génotoxicité mitochondriale aiguë de deux prophylaxies antirétrovirales, 3TC et LPV/r, administrées à des nouveau-nés pour prévenir la transmission du VIH par l'allaitement au cours de la première année de vie. L'évaluation de cette toxicité repose sur l'analyse du nombre de copies d'ADNmt et de la présence d'ADNmt délétés entre le septième jour après la naissance et un an.

Nous avons pu bénéficier des DBS collectés lors de l'essai randomisé contrôlé ANRS 12174 PROMISE PEP (ClinicalTrials.gov : NCT00640263) menés dans quatre pays d'Afrique Sub-Saharienne (Afrique du Sud, Burkina Faso, Ouganda et Zambie) entre 2009 et 2014. Les recommandations OMS en vigueur à l'époque ne recommandaient pas aux femmes infectées un TAR pour contrôler l'infection. Elles ont cependant reçu une prophylaxie ARV pendant leur grossesse dans le cadre de la PTME du VIH. Les CHEU nés de ses mères ont quant à eux reçu sept jours de NVP à la naissance puis ont été sélectionnés de façon aléatoire pour recevoir un traitement à base de 3TC ou de LPV/r, du septième jour après la naissance (D7) jusqu'à une semaine après la fin de l'allaitement, pour une durée maximale de 50 semaines (W50). Brièvement, sur 1273 CHEU inscrits à l'inclusion de l'essai PROMISE PEP, 1236 enfants ont été inclus dans les analyses, après exclusion de 31 perdus de vue (16 dans le LPV/r de 15 dans le bras 3TC) et de 6 violations de protocole. A la fin de la première année de vie, 17 cas d'infections (8 pour le LPV/r et 9 pour le 3TC) et 33 décès ont été rapportés. Les deux régimes prophylactiques ont montré une grande efficacité préventive avec un taux de TME cumulatif à un an de 1.4% pour le LPV/r et 1.5% pour le 3TC en « intention to treat », et <1% en « per protocole ». Aucune différence entre eux ARV n'a été observée au regard des différents effets indésirables sévères rapportés.

Nous avons également pu bénéficier de DBS de CHEU d'Afrique du Sud âgés de 6 semaines et un an, collectés lors de l'évaluation du programme sud-africain de PTME du VIH (*South African Program of Mother-To-Child Transmission evaluation survey*) menée entre 2012 et 2013. Ces CHEU « contrôles » n'ont pas reçu de prophylaxie ARV à leur naissance et sont nés de mères n'ayant pas reçu aucun TAR pendant leur grossesse. La constitution de ce groupe

contrôle de CHEU ne faisait pas partie du protocole de PROMISE PEP et a fait l'objet d'une recherche active pendant cette thèse.

La majorité des études évaluant la génotoxicité mitochondriale des ARV chez les CHEU utilise la technique de PCR quantitative soit à partir de sang total, soit à partir de PBMC isolés. Nous avons ainsi tout naturellement eu recours à la même approche expérimentale. Alors que les PBMC constituent un support de choix pour la quantification de l'ADNmt, l'utilisation des DBS, et donc du sang total, requiert quant à elle un contrôle qualité supplémentaire. En effet, contrairement aux PBMC, le sang total est enrichi en plaquettes. Or, ces dernières comportent exclusivement de l'ADNmt, étant dépourvues de noyau, et peuvent ainsi fausser la quantification de l'ADNmt qui est exprimée en nombre de copie d'ADNmt par cellule, lui-même estimé par le nombre absolu d'un gène nucléaire unique. Nous avons donc effectué au préalable un contrôle de l'influence du nombre de plaquettes sur le nombre de copies d'ADNmt.

La revue de la littérature nous a montré que la valeur absolue du nombre de copie d'ADNmt par cellule variait considérablement selon la méthode utilisée et les laboratoires qui l'utilisaient. En effet, il n'existe pas de valeur normée par tranche d'âge, ni par population ; les données longitudinales sont d'ailleurs rares. Notre choix de la méthode s'est porté sur un kit commercial incluant des calibrateurs que nous avons validés par une étude de robustesse de la PCR quantifiant la délétion de l'ADNmt. Nous nous sommes donc rapprochés du Département de Biochimie et Génétique du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers affilié au Centre de Référence des pathologies mitochondriales. Grâce à notre collaboration et à leur expertise, nous avons pu valider notre approche technique à l'aide de cellules Rho0 dépourvues d'ADNmt et utilisées comme contrôle négatifs des PCR pour le développement des tests cliniques. Par ailleurs, le kit que nous avons utilisé avait été employé par une précédente étude qui avait justifié le thème de cette thèse³³⁹. Nous avons également inclus l'analyse du taux de délétion de l'ADNmt, une donnée qui est rarement incluse dans les études sur les CHEU. De la même façon, grâce à des échantillons de patients atteints de mitochondriopathies obtenus auprès du centre de référence d'Angers, nous avons pu calibrer la technique et fixer un seuil de positivité pour la détection de la délétion de l'ADNmt. Ainsi, notre approche technique pour mesurer la présence de délétion est qualitative.





Pour s'affranchir des valeurs absolues du nombre de copies d'ADNmt par cellule et des variations inter-individuelles, notre analyse se concentrera sur la différence de cette donnée entre la fin de l'exposition à la prophylaxie (W50) et sa valeur initiale (D7). Contrairement aux quelques études de suivi longitudinal du nombre de copies d'ADNmt chez les CHEU, nous

avons attribué un seuil de déplétion que nous avons défini comme une diminution de 50% de la quantité d'ADNmt entre D7 et W50. Ce seuil regroupe les rares données obtenues sur l'évolution du nombre de copies d'ADNmt chez les CHEU. Nous avons pris le parti de définir un tel seuil dans une volonté d'identifier d'éventuels CHEU qui pourraient se trouver les plus fortement impactés par la prophylaxie et dont les manifestations cliniques pourront être analysées à plus long terme.

Ce travail est présenté dans l'article 1 qui suit ; les Supplementary Materials sont disponibles en Annexes.

Article

Mitochondrial DNA Parameters in Blood of Infants Receiving Lopinavir/Ritonavir or Lamivudine Prophylaxis to Prevent Breastfeeding Transmission of HIV-1

Audrey Monnin ^{1,*} , Nicolas Nagot ², Marianne Peries ¹ , Nicolas Meda ³, Mandisa Singata-Madliki ⁴, James K. Tumwine ⁵, Chipepo Kankasa ⁶, Nobubelo Ngandu ⁷, Ameena Goga ⁷, Pascal Reynier ⁸ , Thorkild Tylleskär ⁹ , Philippe Van de Perre ² and Jean-Pierre Molès ¹

¹ Pathogenèse et Contrôle des Infections Chroniques, INSERM U1058, Université Montpellier, Etablissement Français du Sang, 34934 Montpellier, France; marianne.peries@umontpellier.fr (M.P.); roselyne.vallo@umontpellier.fr (R.V.); jean-pierre.moles@inserm.fr (J.-P.M.)

² Pathogenèse et Contrôle des Infections Chroniques, INSERM U1058, Université Montpellier, Centre Hospitalier Universitaire, 34934 Montpellier, France; n-nagot@chu-montpellier.fr (N.N.); p-van_de_perre@chu-montpellier.fr (P.V.d.P.)

³ Centre MURAZ, Bobo-Dioulasso 01 B.P. 390, Burkina Faso; nicolas.meda@gmail.com

⁴ Effective Care Research Unit, Cecilia Makiwane Hospital, University of Fort Hare, East London 5201, South Africa; mandisa.singata@gmail.com

⁵ Department of Paediatrics and Child Health, School of Medicine, College of Health Sciences, Makerere University, Kampala 7062, Uganda; kabaleimc@gmail.com

⁶ Department of Paediatric and Child Health, University Teaching Hospital, Lusaka PO Box 50110, Zambia; ckankasa@zamnet.zm

⁷ Health Systems Research Unit, South African Medical Research Council, Cape Town 7501, South Africa; nobubelo.ngandu@mrc.ac.za (N.N.); ameena.goga@mrc.ac.za (A.G.)

⁸ Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, 49933 Angers, France; pareynier@chu-angers.fr

⁹ Centre for International Health, Faculty of Medicine, University of Bergen, 5009 Bergen, Norway; thorkild.tylleskar@uib.no

* Correspondence: audrey.monnin@inserm.fr; Tel.: +33-434-359-120

Received: 3 August 2020; Accepted: 11 September 2020; Published: 14 September 2020



Abstract: Children who are human immunodeficiency virus (HIV)-exposed but uninfected (CHEU) accumulate maternal HIV and antiretroviral exposures through pregnancy, postnatal prophylaxis, and breastfeeding. Here, we compared the dynamics of mitochondrial DNA (mtDNA) parameters in African breastfed CHEU receiving lopinavir/ritonavir (LPV/r) or lamivudine (3TC) pre-exposure prophylaxis during the first year of life. The number of mtDNA copies per cell (MCN) and the proportion of deleted mtDNA (MDD) were assessed at day 7 and at week 50 post-delivery (PrEP group). mtDNA depletion was defined as a 50% or more decrease from the initial value, and mtDNA deletions was the detection of mtDNA molecules with large DNA fragment loss. We also performed a sub-analysis with CHEU who did not receive a prophylactic treatment in South Africa (control group). From day seven to week 50, MCN decreased with a median of 41.7% (interquartile range, IQR: 12.1; 64.4) in the PrEP group. The proportion of children with mtDNA depletion was not significantly different between the two prophylactic regimens. Poisson regressions showed that LPV/r and 3TC were associated with mtDNA depletion (reference: control group; LPV/r: PR = 1.75 (CI95%: 1.15–2.68), $p < 0.01$; 3TC: PR = 1.54 (CI95%: 1.00–2.37), $p = 0.05$). Moreover, the proportion of children with MDD was unexpectedly high before randomisation in both groups. Long-term health impacts of these mitochondrial DNA parameters should be investigated further for both CHEU and HIV-infected children receiving LPV/r- or 3TC- based regimens.

Keywords: mitochondrial DNA; depletion; deletion; HIV-exposed uninfected children; lopinavir/ritonavir; lamivudine; breastfeeding; Africa

1. Introduction

The most recent World Health Organisation (WHO) guidelines for the prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) recommend lifelong antiretroviral therapy (ART) for all pregnant or breastfeeding HIV-infected women independently of their CD4 count or HIV clinical stage [1]. In addition to in utero exposure to both HIV and the antiretroviral drugs (ARVs), children who are HIV-exposed but uninfected (CHEU) continue to be exposed to HIV and the ARVs during breastfeeding as well as for 6–12 weeks of recommended pre-exposure prophylaxis (PrEP) with either nevirapine (NVP) alone or in combination with zidovudine (ZDV) [1]. Furthermore, maternal ART results in significant ARV drug concentrations in breast milk to which the baby is also exposed for several months [2–5]. In 2019, 15.2 million children were CHEU worldwide, thus exposed to HIV and ARV [6]. Many unfavourable health outcomes have been reported in CHEU such as metabolic disorders [7,8], increased infectious disease morbidity and higher mortality [9–12], impaired growth [13–18], neurodevelopmental delays [17,19–21], altered immunity [10,22–26], and mitochondrial toxicity in comparison to never HIV-exposed children [27–30]. Taken together, this prompted Powis and Siberry to advocate for the long-term follow up of CHEU irrespective of their HIV/ARV exposures [31].

Reduction of mitochondrial DNA (mtDNA) copy number per cell (MCN) is a well-known side effect of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) [32,33]. NRTIs can act as chain terminators either by incorporation into the mtDNA which leads to an aborted replication, or by directly inhibiting DNA polymerase γ , the enzyme responsible for mtDNA replication [32,34]. Depending on the nature of the different NRTI drugs, different degrees of inhibition have been estimated with the following decreasing drug toxicity scheme: zalcitabine \geq didanosine \geq stavudine \gg lamivudine (3TC) $>$ tenofovir $>$ emtricitabine \geq zidovudine $>$ abacavir [32]. As a consequence of the decrease of MCN, the cellular oxidative phosphorylation is disturbed, which leads to increased production of reactive oxygen species (ROS) that in turn may generate mtDNA point mutations and/or deleted mtDNA (MDD) [32,34]. Recent in vitro studies showed that most of the protease inhibitors (PIs) can induce mitochondrial-induced apoptosis [35–37] and increase ROS production [36–40]. These two mechanisms can lead to a decrease of mtDNA content and induce mtDNA mutations, as NRTIs do. Furthermore, LPV-boosted RTV (LPV/r) showed to be the most potent inducer of ROS among the other tested PIs [38]. In this regard, mtDNA depletion has been reported in HIV-infected children receiving ART compared to their healthy counterparts [41–43]. CHEU exposed in utero to ARVs, and particularly to NRTIs, also have lower MCN at birth compared to uninfected children, ranging from 37.0% to 49.0% in cord blood leukocytes [44–47], endothelial cord blood cells [45,46], and PBMCs, which persisted until two years of age with a progressive reversion to baseline mtDNA levels around five years of age [48]. In contrast, several other studies have reported higher MCN at birth [49–52], and in one of them, a longitudinal follow-up showed a decrease over time [52]. In addition, like other cellular DNA, mtDNA is susceptible to acquired mutations [53], and the accumulation of deleted mtDNA (MDD) is part of the ageing process [53,54]. It is noteworthy that mtDNA deletions have rarely been investigated in CHEU and an association with ARV drug exposure has never been demonstrated [55,56].

Our study aimed at evaluating the acute mitochondrial toxicity of an extended PMTCT prophylaxis based on 3TC or LPV/r regimen given to CHEU for one year by analysing mtDNA parameters, i.e., MCN and MDD.

2. Experimental Section

2.1. Design and Study Population

In this longitudinal study, we included CHEU already enrolled in the ANRS 12,174 trial (NCT00640263), referred hereafter as the PrEP group in the main analysis. Samples were collected between November 2009 and May 2012 in four African countries namely Burkina Faso, South Africa, Uganda, and Zambia. The trial protocol and the main findings have been published elsewhere [57,58]. In brief, HIV-infected mothers that enrolled in the trial received ARV prophylaxis during pregnancy and labour as per national PMTCT guidelines at the time of the trial [59]. They had a CD4 cell count above 350 cells/mm³ and were therefore not eligible for ART at that time [59]. Children received 7 days of nevirapine as post-partum prophylaxis. Seven days after birth (D7) and subsequently at one-month intervals, children were screened for HIV infection by HIV DNA polymerase chain reaction (PCR). HIV-negative children were included in the trial and randomized to receive either LPV/r or 3TC during breastfeeding (maximum 50 weeks, W50). Prophylaxis was discontinued one week after the cessation of breastfeeding, or at W50 (maximum duration).

Criteria for 1236 CHEU included: (1) provision of informed consent to store and use samples for future research, (2) completion of the W50 visit, (3) availability of dried blood spots (DBS) for the D7 and W50 visits and, (4) not HIV-infected at W50. Among these eligible participants, 200 CHEU were randomly chosen in each of the three trial sites (Ouagadougou, Burkina Faso; Mbale, Uganda and Lusaka, Zambia). For the fourth site (East London, Eastern Cape province, South Africa), 50 children were randomly chosen from a restricted list, created for a sub-study on in-depth adherence evaluation and treatment acceptability. The gender ratio of the participants was roughly 1:1 (Male:Female). Socio-demographic, biological, clinical, and infant feeding characteristics for all mothers and children were obtained from the ANRS 12174 trial database. Maternal CD4 cell count was measured before delivery and plasma HIV viral load at 38 weeks (W38) post-partum. Plasma HIV RNA under 1000 copies/mL was considered as a controlled viral load [1].

We also included a control group of 40 South African CHEU from the South African prevention of mother-to-child transmission evaluation survey (recruitment from September 2012 to March 2013) [60]. This national program enrolled CHEU aged of 4–8 weeks, attending clinics for their first immunization visit. Although WHO guidelines at that time recommended maternal ARV prophylaxis from 14 weeks of gestation until 7 days after giving birth and infant prophylaxis for 6 weeks or until one week after cessation of breastfeeding (WHO Option A), these 40 CHEU had not been exposed to any maternal or infant ARV prophylaxis [60]. Indeed, mothers of these children did not know their HIV positive status, thus they had not received ARV prophylaxis, nor had their children. These mothers were identified because their babies tested HIV antibody positive. This group of CHEU was referred to the control group in a sub-analysis restricted to South African children. These CHEU came from eight provinces of South Africa (Eastern Cape, Free State, Gauteng, Kwazulu Natal, Mpumalanga, Northern Cape, and Northern West and Western Cape). Samples were collected at six weeks of age (W6) because samples at D7 were not available, and at W26 and W50.

The primary outcomes were the proportion of children with mitochondrial DNA (mtDNA) depletion at W50 (PrEP group) or W26 (control group) and the proportion of children with mtDNA deletions at D7 and W50 (PrEP group) or at W6 and W26 (control group).

2.2. Sample Collection and Processing

Capillary blood samples were collected by heel prick on Whatman 903 cards (DBS) and stored at −20 °C at the study sites. DNA extraction was performed from 3-mm diameter punches ($n = 3$) using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturers' instructions. Extracted DNA were stored at −80 °C.

2.3. Mitochondrial DNA Parameters Assays

2.3.1. Mitochondrial DNA Copy Number Per Cell

Blood mtDNA content was assessed using the QuickScan™ Mitox assay (Primagen, Amsterdam, Netherlands) [61]. mtDNA (RNR2 gene; forward 5'-GGGCTCTGCCATCTTAA-3' and reverse 5'-GTAATCCAGGTCGGTTTCTA-3') and nuclear DNA (snRNP U1A gene; forward 5'-CGGCATGTGGTGCATAA-3' and reverse 5'-TGCGCCTCTTTCTGGGTGTT-3') were amplified by quantitative PCR (qPCR) on extracted DNA and quantified using calibrators provided by the manufacturer. Results were given as mtDNA copy number per cell (MCN) using Equation (1) (according to the manufacturer instructions):

$$MCN = 2^{([Ct(A)*E(A)]-[Ct(B)*E(B)])}, \quad (1)$$

where Ct is Cycle threshold, E is efficacy of the PCR, and A and B are the genes of interest, respectively, mtDNA and U1A (see the Methodology details section in the Supplementary Materials for descriptive statistics of the assay).

As a quality control, we used a modified analysis flow described by Ashar et al. to check for nuclear DNA degradation. At all points in time (D7, W6, W26, and W50 in the PrEP and control groups), if a cycle threshold (Ct) for U1A was not comprised between the mean of all the $Ct \pm (2 \times \text{standard deviation})$, the sample was removed from the analysis [62].

Because we quantified MCN in whole blood, we also performed correlation analyses for each site at all points in time between platelet count and MCN using Spearman's rank-order correlation. A site was excluded from the analysis if the absolute value of Rho was ≥ 0.3 with $p \leq 0.05$. We further controlled for the mitochondria-rich platelet content using platelets and leucocytes enumerated on the MCN values at D7 by applying the formula proposed by Hurtado et al. [63]. We assumed that raw data were validated if the difference between them and corrected data did not exceed 10%.

The decrease in MCN between the MCN measured at t_0 (D7 or W6) and the one measured at t_1 (W26 or W50) was calculated according to Equation (2):

$$\frac{(MCN \text{ at } t_0) - (MCN \text{ at } t_1)}{MCN \text{ at } t_0} \times 100, \quad (2)$$

We defined mtDNA depletion as a 50% or more decrease in MCN from D7 to W50 for the PrEP group or from W6 to W26 for the control group. No given threshold for mtDNA depletion is described in the literature and a few longitudinal studies have reported conflicting results. Indeed, reports from birth to one year of age in healthy US children have shown no variation of MCN in leucocytes [48], increased MCN in leucocytes [44], or decreases of MCN by 29% in PBMC [52]. Another Chinese study showed a decreasing trend of MCN during the first two years of life [64]. For CHEU, US studies have reported a decrease of MCN by 5.3% in PBMC [52], or an increase of MCN in leucocytes [44]. As a conservative threshold, a 50% reduction encompassed all of these reported values.

2.3.2. Mitochondrial DNA Deletion

Primers MITO which target a mtDNA region where no deletion has been reported (forward 5'-CTAAATAGCCACACGTTCCC-3' and reverse 5'-AGAGCTCCCGTGAGTGGTTA-3') and primers DEL which target a region that encompasses 84% of the reported deletions so far (forward 5'-CTGTTCCCAACCTTTTCCT-3' and reverse 5'-CCATGATTGTGAGGGGTAGG-3') were used in a duplex qPCR as previously described [65]. qPCRs were performed on a LightCycler® 480-II System (Roche, Bâle, Switzerland) using the following cycling program: 95 °C for 10 min; 40 cycles at 95 °C for 15s, 55 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. The final reaction volume was 25 µL and contained 10 µL LightCycler®480 Probes Master mix (Roche, Bâle, Switzerland), each mitochondrial DNA primer at

500 nM and their respective probes at 50 nM and 150 nM for MITO and DEL, respectively. Results were obtained as a proportion of deleted mtDNA (MDD).

We considered children as being with MDD when the proportion of deleted mtDNA was above 2.3% of the total mtDNA. This value was determined as the mean value obtained for 10 healthy newborns + 3 standard deviations. Because we did not have enough samples with a known percentage of deletion to test for the proportionality of this assay, we used the results in a qualitative manner.

Both qPCRs were validated by DNA samples provided by a reference center for mitochondrial diseases from Angers, France (see the Appendices A and B for methodology details related to mitochondrial DNA parameters assays and Supplementary Materials Figures S1 and S2 for descriptive statistics of the deletion assay and results details for the quality control of DNA).

The analysis flow for MCN measurement is summarised in Figure 1.

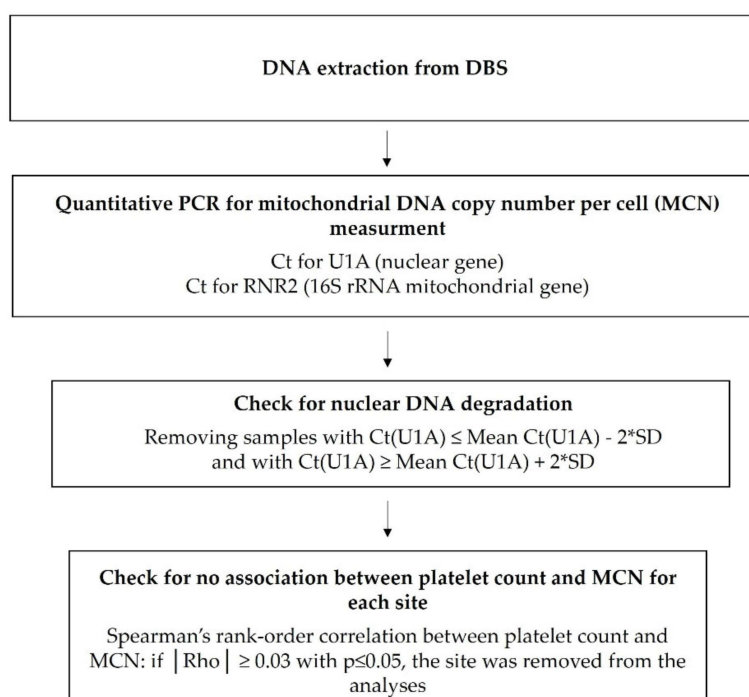


Figure 1. Analysis flow for mitochondrial DNA copy number per cell assessment. Abbreviations: DBS, dried blood spot; PCR, polymerase chain reaction; Ct, cycle threshold; SD standard deviation.

2.4. Statistical Analysis

The data were described as frequencies with percentages for categorical variables, and medians with interquartile ranges (IQR) or means with standard deviations (SD) for non-Gaussian or Gaussian continuous variables, respectively. Prophylactic treatment comparisons were performed using Chi square or Fisher's exact tests for categorical variables and Wilcoxon Mann–Whitney test for non-Gaussian continuous variables or Student's t-test for Gaussian continuous variables.

Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number per cell (MCN) at baseline was compared between sites using Kruskal–Wallis test because the variable did not fulfil the normality condition. Wilcoxon Mann–Whitney test was used for paired comparisons. MCN between genders at baseline was compared using Wilcoxon Mann–Whitney test. We performed a Spearman's rank correlation test to address whether there was a correlation between HIV-related maternal characteristics at baseline and MCN at D7.

In order to evaluate the impact of 3TC and LPV/r on mtDNA, both mtDNA depletion and mtDNA deletion were assessed. Prophylactic treatments comparison was performed using Wilcoxon Mann–Whitney test and Chi square test. In order to address whether the prophylaxis was associated with mtDNA depletion, we used Poisson regression with robust error variance to model the probability of having a mtDNA depletion ($\geq 50\%$ reduction of MCN) at W26 in a sub-analysis

restricted to the South African site including CHEU children who did not received a postnatal prophylactic treatment (control group). Variables with $p \leq 0.25$ in the bivariate analysis were included in the multivariable analysis. Variables were then selected according to a backward elimination for minimizing the Akaike information criterion (AIC). The confidence level was set at 95% and power at 80%. The same plan of analysis was used in order to characterise the impact of each drug on mtDNA depletion in this sub-analysis. Statistical analyses were performed using SAS studio (Copyright © 2012–2016, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.5. Ethics Considerations

Written informed consents were obtained from the mother or legal representative prior to enrolment in the ANRS 12,174 trial (NCT00640263). The protocol was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Biomedical Research Ethics Committee in Zambia (No 008-02-080), the Uganda National Council for Science and Technology (No HS 470), the Stellenbosh University ethics committees for South Africa (No M09/11/043) and the Ethical Committee for Health Research in Burkina Faso (No 2008-039).

3. Results

3.1. Study Population Characteristics of the PrEP Group

After quality control assessment and mtDNA confounds (see Supplementary Materials), a total of 139 CHEU were included for further analysis: 46 children from Burkina Faso, 48 from South Africa, and 45 from Uganda (Figure 2).

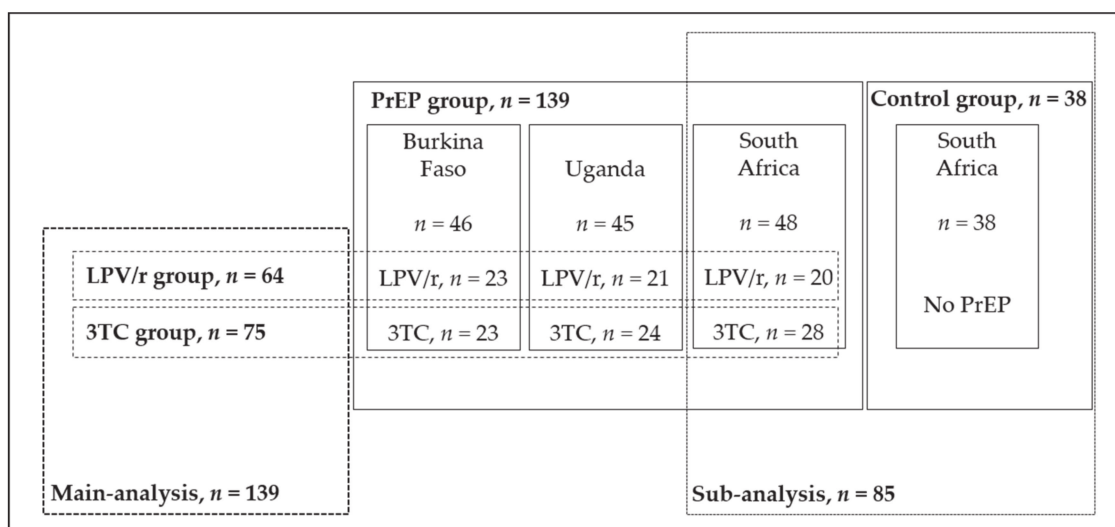


Figure 2. Details of the distribution of final populations analysed by country, group and treatment. LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; PrEP, pre-exposure prophylaxis.

At day 7, the mean infant weight was 3.2 ± 0.5 kg (Table 1). Most newborns were born at term and 23 were born at week 36 of the pregnancy. Only two of them had a gestational age under 36 weeks. The majority of children had normal haemoglobin (93.5%) and alanine aminotransferase (92.8%) concentrations, platelet count (94.8%), and white blood cell count (100.0%).

Table 1. Children’s characteristics at PrEP randomisation (D7).

Characteristic	LPV/r (n = 64)	3TC (n = 75)	Total (n = 139)	p Value ^a
Gender; n (%)				0.96
Male	33 (51.6)	39 (52.0)	72 (51.8)	
Weight (kg); mean ± SD	3.1 ± 0.5	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.5	0.19
Height (cm); mean ± SD	49.2 ± 2.1	49.8 ± 2.0	49.5 ± 2.0	0.11
Gestational age (week); mean ± SD	38.3 ± 1.7	38.5 ± 1.9	38.4 ± 1.8	0.30
Preterm birth (week); n (%)				0.82
No prematurity ≥ 37	53 (82.8)	61 (81.3)	114 (82.0)	
Prematurity < 37	11 (17.2)	14 (18.7)	25 (18.0)	
Haemoglobin (g/dL); median [IQR]	16.1 [15.0;17.3]	16.1 [14.6;17.3] †	16.1 [14.9;17.3] †	0.91
ALT (U/L); n (%)				0.88
Normal ≤ 40	59 (92.2)	70 (93.3)	129 (92.8)	
Abnormal > 40	5 (7.8)	5 (6.7)	10 (7.2)	
Mild [40;100]	3 (4.7)	4 (5.3)	7 (5.0)	
Moderate [100;200]	2 (3.1)	1 (1.3)	3 (2.2)	
Haemoglobin (g/dL); n (%)				0.10
Normal > 13	62 (96.9)	67 (90.5) †	129 (93.5) †	
Anemia ≤ 13	2 (3.1)	7 (9.5) †	9 (6.5) †	
Mild [12;13]	1 (1.6)	6 (8.1) †	7 (5.1) †	
Moderate [10;12]	-	1 (1.4) †	1 (0.72) †	
Very severe [0;9]	1 (1.6)	-	1 (0.72) †	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.43
Normal ≥125	59 (92.2)	69 (97.2) ‡	128 (94.8) ‡	
Thrombocytopenia <125	5 (7.8)	2 (2.8) ‡	7 (5.2) ‡	
Mild [100;125]	3 (4.7)	2 (2.8) ‡	5 (3.7) ‡	
Moderate [50;100]	1 (1.6)	-	1 (0.7) ‡	
Very severe [0;25]	1 (1.6)	-	1 (0.7) ‡	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal > 2.5	64 (100.0)	73 (100.0) §	137 (100.0) §	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.22
Normal > 1.5	62 (96.9)	73 (100.0) §	135 (98.5) §	
Neutropenia ≤ 1.5	2 (3.1)	-	2 (1.5) §	
Mild [1.25;1.5]	1 (1.6)	-	1 (0.7) §	
Moderate [1.0;1.25]	1 (1.6)	-	1 (0.7) §	

† one missing value, ‡ four missing values, § two missing values. ^a Chi-square test or Fisher’s exact test as appropriate and Student’s t-test or Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: PrEP, Pre-exposure prophylaxis; D7, day 7; SD, standard deviation; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; ALT, Alanine Aminotransferase, NA, non applicable.

All of the participating mothers had a CD4 cell count above 350 cells/mm³ before delivery, and 66.7% had a controlled HIV viral load at D7 (Table 2). Most of them had received zidovudine as prophylaxis during pregnancy for an average of eight weeks. At week 38 post-partum, viral load was uncontrolled in 61.2% of mothers.

No differences in infant or maternal characteristics exist between the two arms. The study population characteristics by study site are presented in Supplementary Tables S1–S6.

Table 2. Maternal characteristics at randomisation (D7) and during follow up.

Characteristic	LPV/r (n = 64)	3TC (n = 75)	Total (n = 139)	p Value ^a
At randomisation (D7)				
<i>Social demographic characteristics</i>				
Age (year); median [IQR]	27.1 [24.1;30.7]	28.2 [24.2;32.6]	27.4 [24.1;32.2]	0.25
Parity; median [IQR]	3.0 [2.0;3.5]	2.0 [1.0;4.0]	3.0 [2.0;4.0]	0.56
<i>Clinical and biological characteristics</i>				
BMI; median [IQR]	24.0 [21.4;27.5]	23.4 [21.4;27.7]	23.8 [21.4;27.7]	0.88
CD4 cells count (cells/mm ³); median [IQR]	556.0 [407.0;784.0] †	584 [433.0;760] ‡	558.0 [420.0;766.0] §	0.91
HIV viral load (Log copies/mL); median [IQR]	2.2 [2.2;3.3]	2.2 [2.2;3.3] ¶	2.2 [2.2;3.3] ¶	0.79
HIV viral load control; n (%)				0.33
Controlled <1000 copies/mL	40 (62.5)	52 (70.3) ¶	92 (66.7) ¶	
Uncontrolled ≥1000 copies/mL	24 (37.5)	22 (29.7) ¶	46 (33.3) ¶	
WHO HIV staging; n (%)				1.00
Stage 1	60 (93.8)	71 (94.7)	131 (94.2)	
Stage 2	4 (6.2)	4 (5.3)	8 (5.8)	
<i>Antiretroviral prophylaxis</i>				
ARV prophylaxis during pregnancy; n (%)				0.47
ZDV	45 (70.3)	51 (68.0)	96 (69.1)	
ZDV + 3TC	11 (17.2)	18 (24.0)	29 (20.9)	
No ARV prophylaxis	8 (12.5)	6 (8.0)	14 (10.1)	
Duration of ARV prophylaxis taken during pregnancy (week); median [IQR]	8.0 [5.5;12.5] †	8.0 [4.0;14.0] ◻	8.0 [5.0;13.0] £	0.63
During the trial				
HIV viral load at W38 (Log copies/mL); median [IQR]	3.7 [2.2;4.8]	3.4 [2.2;4.5]	3.5 [2.2;4.7]	0.23
HIV viral load control at W38; n (%)				0.18
Controlled < 1000 copies/mL	21 (32.8)	33 (44.0)	54 (38.9)	
Uncontrolled ≥ 1000 copies/mL	43 (67.2)	42 (56.0)	85 (61.2)	
Duration of breastfeeding (week); median [IQR]	45.6 [38.8;48.8]	46.0 [35.7;48.6]	45.9 [37.6;48.1]	0.95

† seven missing values, ‡ ten missing values, § seventeen missing values, ¶ one missing value, † eight missing values, ◻ six missing values, £ fourteen missing values. ^a Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: D7, day 7; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; BMI, body mass index; HIV, Human immunodeficiency virus; WHO, World Health Organization; ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine; W38, week 38.

3.2. mtDNA Content and Proportion of Deleted mtDNA at D7

At D7 (baseline), mitochondrial DNA copy number per cell (MCN) measured in the PrEP group ($n = 139$) varied from 103 to 1770 copies/cell with a median of 846 and IQR of 555 to 1082 (Table 3). The median MCN in the LPV/r group was 897 (614; 1135) and those in the 3TC group was 803 (484; 1056) ($p = 0.08$). MCN at baseline differed according to study sites ($p < 0.01$, Kruskal–Wallis test) (Table 3). MCN in South Africa was lower than those observed for Burkina Faso and Uganda which were similar (South Africa versus Burkina Faso, p value < 0.01 ; South Africa versus Uganda, p value < 0.01 ; Burkina Faso versus Uganda, p value = 0.34). We did not observed difference in MCN according to the gender (Supplementary Table S7). Spearman’s rank correlation test showed that HIV-related maternal characteristics, i.e., CD4 cell count and viral load at D7, did not correlate with MCN at D7 (CD4: $Rho = 0.09$, $p = 0.31$, $n = 122$; HIV viral load: $Rho = -0.03$, $p = 0.72$, $n = 138$). Using the experimental threshold for positivity (see Appendix B), 99.3% of children harboured MDD (Table 3).

Table 3. mtDNA copy number per cell (MCN) and proportion of children with deleted mtDNA (MDD) at PrEP randomisation (D7) by study site.

Site	PrEP	<i>n</i>	MCN Median [IQR]	<i>n</i>	Children with MDD, <i>n</i> (%)
Burkina Faso	All	46	922 [700;1112]	44	43 (97.7)
	LPV/r	23	947 [757;1253]	23	22 (95.7)
	3TC	23	833 [671;1112]	21	21 (100.0)
South Africa	All	48	473 [329;799]	48	48 (100.0)
	LPV/r	20	624 [447;1191]	20	20 (100.0)
	3TC	28	422 [273;715]	28	28 (100.0)
Uganda	All	45	976 [814;1099]	45	45 (100.0)
	LPV/r	21	975 [814;1083]	21	21 (100.0)
	3TC	24	1002 [819;1100]	24	24 (100.0)
All	All	139	846 [555;1082]	137	136 (99.3)
	LPV/r	64	897 [614;1135]	64	63 (98.4)
	3TC	75	803 [484;1056]	73	73 (100.0)

Abbreviations: PrEP, pre-exposure prophylaxis; MCN, mitochondrial DNA copy number per cell; MDD, deleted mitochondrial DNA; D7, day 7; IQR, interquartile range; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine.

3.3. mtDNA Content and Proportion of Deleted mtDNA after One Year of PrEP

After one year of PrEP, the overall level of MCN decreased as compared to the matched baseline D7 value, with a median decrease of MCN of 41.7% and IQR of 12.1 to 64.4 (Table 4). This variation differed according to study sites. The overall median decrease of MCN was similar between groups (40.1% for LPV/r versus 42.2% for 3TC, $p = 0.35$). mtDNA depletion was observed in 58 children (41.7%), 27 (42.2%) in the LPV/r group and 31 (41.3%) in the 3TC group (3TC versus LPV/r: $p = 0.97$) (Table 4). As we observed a trend toward an interaction between the prophylactic treatment and the site on mtDNA depletion ($p = 0.09$), we presented the results according to study sites. MDD was detected in all CHEU at week 50.

Table 4. Variation of mtDNA copy number per cell (MCN) and number of children with mtDNA depletion ($\geq 50\%$ reduction) after one year of PrEP by study site.

Site	PrEP	n	Decrease of MCN Median [IQR]	p Value ^a	Children with Depletion, n (%)	p Value ^b
Burkina Faso	All	46	30.2% [2.5;54.4]	0.12	13 (28.3)	0.33
	LPV/r	23	39.3% [12.1;65.9]		8 (34.8)	
	3TC	23	17.3% [-7.7;49.8]		5 (21.7)	
South Africa	All	48	63.3% [37.8;75.0]	0.02	30 (62.5)	0.13
	LPV/r	20	73.2% [50.9;85.6]		15 (75.0)	
	3TC	28	52.8% [34.8;70.4]		15 (53.5)	
Uganda	All	45	35.4% [4.8;52.9]	0.08	15 (33.3)	0.06
	LPV/r	21	17.8% [0.4;43.1]		4 (19.0)	
	3TC	24	49.2% [21.1;59.3]		11 (45.8)	
All	All	139	41.7% [12.1;64.4]	0.35	58 (41.7)	0.97
	LPV/r	64	40.1% [14.6;72.7]		27 (42.2)	
	3TC	75	42.2% [6.9;60.2]		31 (41.3)	

^a Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. ^b Chi square test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: mtDNA, mitochondrial DNA; MCN, mitochondrial DNA copy number per cell; PrEP, pre-exposure prophylaxis; IQR, interquartile range; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine.

3.4. Sub-Analysis of MCN and MDD Variations among CHEU from South Africa

To answer whether prophylaxis was responsible for mtDNA depletion and deletion, we performed a sub-analysis including a control group of South African CHEU not receiving prophylaxis (Figure 2). As we reported above, both MCN and MDD were site dependent and, due to the inaccessibility of samples from children who had not received prophylaxis for the three sites, we restricted this analysis to South African CHEU. There were no significant differences in the maternal or children’s characteristics between the control group and the PrEP group at baseline (W6) except for the province of residency, prematurity and breastfeeding practice (Supplementary Table S8).

Evolution of MCN from W6 to W50 revealed that the decrease of MCN occurred during the first six months of life in CHEU in both the control group and the PrEP group. At baseline, MCN were significantly higher in the PrEP group compared to the control group (Table 5), but the inverse trend was observed at W26.

Table 5. mtDNA copy number per cell (MCN) at baseline (W6) and at W26 in South African CHEU from the control group and the PrEP group.

Group	PrEP	n	W6 MCN Median [IQR]	p Value ^a	W26 MCN Median [IQR]	p Value ^a
Control	No	38	347 [258;407]		194 [167;248]	
	Yes	47	458 [310;796]	<0.01	138 [122;148]	<0.01
PrEP	LPV/r	19	682 [364;1220]	<0.01	132 [123;143]	<0.01
	3TC	28	422 [273;691]	0.07	141 [122;148]	<0.01

^a Wilcoxon Mann-Whitney test for comparison between “Control group” versus “PrEP group”, “Control group” versus “PrEP group LPV/r” and “Control group” versus “PrEP group 3TC”. Abbreviations: MCN, mitochondrial DNA copy number per cell; W6, week 6; W26, week 26; CHEU, children who are HIV-exposed uninfected; PrEP, pre-exposure prophylaxis; IQR, interquartile range; mtDNA, mitochondrial DNA; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine.

The decrease of MCN was greater in the PrEP group with a median of 71.3% [59.0;82.1] compared to the control group median of 47.7% (10.4; 55.9) (Table 6). At W26, mtDNA depletion was observed in 16 children (42.1%) in the control group and in 39 children (83.0%) in the PrEP group (Table 6). The proportion of children with MDD was 86.8% in the control group and 100.0% in the PrEP group.

Table 6. Decrease of MCN between baseline (W6) and W26 and mtDNA depletion ($\geq 50\%$ reduction) in South African CHEU from the control group and the PrEP group.

Group	PrEP	n	Decrease of MCN Median [IQR]	p Value ^a	Children with mtDNA Depletion, n (%)
Control	No	38	47.7% [10.4;55.9]		16 (42.0)
	Yes	47	71.3% [59.0;88.1]	<0.01	39 (83.0)
PrEP	LPV/r	19	79.4% [61.8;88.2]	<0.01	17 (89.5)
	3TC	28	70.5% [55.3;78.9]	<0.01	22 (78.6)

^a Wilcoxon Mann-Whitney test for comparison between “Control group” versus “PrEP group Yes”, “Control group” versus “PrEP group LPV/r” and “Control group” versus “PrEP group 3TC”. Abbreviations: MCN, mitochondrial DNA copy number per cell; W6, week 6; W26, week 26; CHEU, children who are HIV-exposed uninfected; PrEP, pre-exposure prophylaxis; IQR, interquartile range; mtDNA, mitochondrial DNA; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine.

Risk factor analysis of mtDNA depletion using multivariable Poisson regression with robust error variance after adjustment for confounders showed that infant prophylaxis was positively associated with mtDNA depletion at W26 with an adjusted prevalence ratio (PR) of 1.63 (95% CI: 1.08–2.45) $p < 0.02$ (Table 7). When the type of prophylaxis was introduced, both LPV/r and 3TC treatment were positively associated with mtDNA depletion with an adjusted PR of 1.75 (95%CI: 1.15–2.68; $p < 0.01$) and of 1.54 (95% CI: 1.00–2.37; $p = 0.05$), respectively. Of note, male gender was also a risk factor of mtDNA depletion with an adjusted PR around 1.39 in the two models (Table 7).

Table 7. Risk factors associated with mtDNA depletion ($\geq 50\%$ reduction) after six months of PrEP in CHEU from South Africa.

Independent Variable	Crude Estimates			Adjusted Estimates		
	PR	95% CI (LB-UB)	p Value	PR	95% CI (LB-UB)	p Value
Gender						
Girl	1.0			1.00		
Boy	1.42	1.03–1.97	0.03	1.39	1.05–1.84	0.02
PrEP *						
No	1.0			1.00		
Yes	1.97	1.33–2.92	<0.01	1.63	1.08–2.45	0.02
Mother age (per 5 years)	1.05	0.92–1.19	0.47			
Parity	0.95	0.81–1.12	0.56			
Duration of breastfeeding (weeks)						
<39	1.00					
≥ 39	0.85	0.63–1.15	0.30			
Gestational age (weeks)	1.05	0.98–1.13	0.17	1.08	0.98–1.19	0.11
Weight of the infant at W6 (per 500 g)	0.98	0.91–1.07	0.69			

* “PrEP No” refers to the control group and “PrEP Yes” refers to the PrEP group. Abbreviations: mtDNA, mitochondrial DNA; PrEP, pre-exposure prophylaxis; CHEU, children who are HIV-exposed uninfected; PR, prevalence ratio; CI, confidence interval; LB, lower bound; UB, upper bound; W6, week 6.

4. Discussion

In our study, CHEU receiving LPV/r as prophylaxis for one year had the same mtDNA depletion as those receiving 3TC. The sub-analysis with South African control CHEU strongly suggests that both prophylactic regimens are associated with an increased level of MCN depletion. We did not assess the impact of prophylaxis on MDD because the proportion of children with MDD at birth was already high.

We used a threshold for mtDNA depletion of a 50% decrease at W50 or W26, respective to their baseline value (D7 or W6). Using this threshold, the observed decrease of MCN in the PrEP group was greater than any other reported so far. Studies from CHEU have reported an MCN increase in leukocytes from birth to one or two years of age [44], or an unchanged MCN until two years old in

PBMCs [48]. Recently, Ajaykumar et al. observed a mild 5.3% decrease of MCN in PBMCs in more than 100 CHEU at one year of age [52]. It is noteworthy that CHEU from South Africa had the larger decrease of MCN given that samples were collected, stored and extracted according to the same procedures, and all the data was analysed using the same quality controls for DNA integrity and PCR validation. In addition, ARV prophylaxis received during pregnancy as per PMTCT national guidelines does not explain this difference. In the South African sub-analysis, we showed that “receiving a prophylaxis” was a risk factor associated with the mtDNA depletion observed in the first six months of life. Furthermore, South African children receiving LPV/r showed a larger decrease in MCN than those receiving the 3TC, which is compatible with a higher toxic effect of LPV/r to 3TC. The deleterious impact of NRTIs, including 3TC, on MCN is commonly recognized in the literature [32–34]. PIs and particularly LPV/r—on the other hand—have not been tested. Thus, LPV/r toxicity was unexpected but could be the result of elevated oxidative stress. Indeed, Taura et al. reported that LPV was the most potent inducer of ROS production in PBMCs among the PIs [38]. This production was recently shown to be an alternative mechanism of NRTI-dependent mitochondrial toxicity [66]. Even if the downstream consequences of the ROS production in this context is not clearly established, mtDNA damage might represent a side effect of LPV/r treatment. It should, however, be mentioned that LPV/r excipients consisting of polypropylene glycol and alcohol might also play a role in the process. Further in vitro studies are necessary to assess this hypothesis. The risk factor analysis showed that male gender was positively associated with mtDNA depletion. This sex-driven response has not been reported yet in CHEU. Animal studies in rats and rodents have shown that ROS production was higher in males than in females in several organs including the liver, brain, skeletal muscles and heart [67]. Rodent brains also exhibited higher oxidative damage in males [67]. Taken together, one could suggest that boys are more vulnerable to mtDNA depletion through increased ROS-induced mtDNA damage. Further studies specifically designed for this question are needed.

In the present study, we used MDD as a qualitative variable for mtDNA deletions because we did not validate the linearity of the technique, only the limit of positivity. The proportion of CHEU in the PrEP group with deleted mtDNA at D7, irrespective of the site, was unexpectedly high. To date, Maagaard et al. reported such high prevalence of MDD (75%) in the blood of HIV-infected adults [68]. To our knowledge, two studies have investigated MDD in CHEU, one including Tanzanian children at birth reported a low frequency of MDD [56], and another including US children aged 18 months did not report MDD [55]. These three studies were not quantitative either and did not indicate the limit of positivity. Although the detection of MDD is not reassuring since such mutations cannot be repaired and may accumulate with age [69], it should be kept in mind that cells have more than hundred mtDNA copies, and both deleted and wild type copies co-exist. As a consequence, the expression of such a mutation is considered as recessive. Additional studies using quantitative assays, like combination of next-generation sequencing and advanced sequence analysis, are clearly needed to conclude on the effects of these exposures.

Detecting mtDNA depletion in CHEU raises concerns about its impact on health. It was previously reported that the decrease of MCN is partially reversible as it rebounds upon drug discontinuation [48,70]. On the other hand, CHEU have many unfavourable health outcomes due to unidentified mechanisms. A long-term follow-up of these children, including growth and neurodevelopment outcomes, might bring new insights on this matter.

This study had several limitations. The initial trial did not include children that were not receiving the prophylaxis. Therefore, we cannot draw conclusions on the level of impact of these two prophylaxis regimens on mitochondrial parameters. The sub-analysis in South Africa did include a control group of CHEU but they originated from different provinces. However, they were highly comparable with South African CHEU from the PrEP group and we were able to match the analysis to the same time points, allowing for an age-matched comparison. We were unable to analyse all the MCN corrected by the Hurtado’s formula because we did not record the leucocyte and platelet counts at W50 in the database [63]. However, corrected MCN values at D7 were not significantly different from the raw

values. Finally, the maternal HIV viral loads at the time of collection were not available and could not be included in the risk factors analysis.

Our study offers several strengths. First, the random selection of these samples among the participants randomised in the ANRS 12,174 trial minimizes the risk of any selection bias. Adherence to the LPV/r or 3TC was also well monitored and controlled throughout the trial. This group of children not infected but receiving ARV prophylaxis for one year is unique. Our study design compared the variation of the MCN for each individual reducing misinterpretations from cross-sectional studies. Furthermore, the different levels of quality checks (DNA integrity using a more stringent rule for removing samples, i.e., 2 SD versus 5 SD, corrected MCN taking into account platelet and leucocyte counts using the formula of Hurtado et al. [63], and correlation analyses between platelet count and MCN) have already been used and published by others who have worked on the general population or key populations, i.e., drug users [62,71]. Finally, our study's large sample size ensures powerful analysis of data.

5. Conclusions

Mitochondrial depletion was detected in CHEU receiving 3TC but also LPV/r, an antiprotease inhibitor. This class of molecule has never been associated with mitochondrial toxicity, so far. HIV and/or ARV exposures during pregnancy are clearly the prime candidates to explain the unexpectedly high prevalence of children with deleted mtDNA. Long term follow-up of CHEU analysing these outcomes is required as such mutations may accumulate with age.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/9/9/2972/s1>, Results details: Quality control of DNA; Figure S1: Descriptive statistics of the mitochondrial DNA deletion assay, Figure S2: Intra- and inter-run variations of the mitochondrial DNA deletion assay; Table S1: Children' characteristics at PrEP randomisation (day 7) in Burkina Faso, Table S2: Maternal characteristics at randomisation (day 7) and during follow up in Burkina Faso, Table S3: Children' characteristics at PrEP randomisation (day 7) in South Africa, Table S4: Maternal characteristics at randomisation (day 7) and during follow up in South Africa, Table S5: Children' characteristics at PrEP randomisation (day 7) in Uganda, Table S6: Maternal characteristics at randomisation (day 7) and during follow up in Uganda, Table S7: mtDNA content at randomisation (D7) according to the gender, Table S8: Description of children' and maternal characteristics in South Africa.

Author Contributions: Conceptualization, N.N. (Nicolas Nagot), T.T., P.V.d.P., and J.-P.M.; methodology, M.P. and N.N. (Nicolas Nagot); validation, R.V., M.P., and J.-P.M.; formal analysis, A.M., M.P., and R.V.; investigation, A.M., N.M., M.S.-M., J.K.T., C.K., and N.N. (Nobubelo Ngandu); data curation, A.M., R.V., and M.P.; writing—original draft preparation, A.M., N.N. (Nicolas Nagot), and J.-P.M.; writing—review and editing, A.M., N.N. (Nicolas Nagot), M.P., N.M., J.K.T., A.G., P.R., T.T., P.V.d.P., and J.-P.M.; supervision, N.M., M.S.-M., J.K.T., C.K., and N.N. (Nobubelo Ngandu); funding acquisition, N.N. (Nicolas Nagot), P.V.d.P., T.T., C.K., and J.-P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Pierre Bergé endowment fund in collaboration with SIDACTION, grant number AP-FPB-2013-2/09, and sponsored by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS#12174 and ANRS12341). A.M. is the beneficiary of a doctoral scholarship from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS12174-B90).

Acknowledgments: We thank the funder of this research and all the participating mothers, children and caregivers.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funder had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Appendix A. Methodology Details for Mitochondrial DNA Parameters Assay

Appendix A.1. Mitochondrial DNA Copy Number Per Cell

The interplate mean of variation coefficients were 4.0% at D7, 3.0% at W6, 3.0% at W26 and 5.0% at W50. Mean Ct for U1A at D7, W6, W26 and W50 were 27.3 ± 2.3 , 25.7 ± 0.8 , 25.2 ± 0.7 and 27.0 ± 2.6 , respectively.

Appendix A.2. Mitochondrial DNA Deletion

The performance of the assay was validated after a repetitive series of qPCR ($n = 16$) on a single whole blood extracted-DNA whose known concentration ranged from 0.1 ng to 100 ng per assay. Intra- and inter-run variations were 1.8% and 2.65% for MITO, respectively and 1.5% and 2.39% for DEL, respectively (Supplementary Figures S1 and S2).

The efficiency of each individual qPCR was calculated on DNA extracted from platelets cell pellets without nuclear DNA (Etablissement français du Sang, Montpellier, France). DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with RNase treatment and standard curves were constructed for the two pairs of primers using mtDNA whose concentration ranged from 104 to 108 ng/ μ L.

For the calculation of the proportion of deleted mtDNA (MDD, in %), MITO and DEL experimental values were corrected for their respective qPCR efficiency. We then calculated the proportion of MDD using Equation (3):

$$\text{MDD} = \frac{\text{corrected MITO value} - \text{corrected DEL value}}{\text{corrected MITO value}} * 100 \quad (3)$$

Appendix B. Methodology Details for the Validation of qPCR

The accuracy of the quantification methods was further validated by means of various DNA samples from Rho0 cells, from patients carrying mtDNA deletions, and dried blood from healthy newborns provided by a reference center for mitochondrial diseases of Angers (France). Briefly, qPCR assaying MCN were performed on Rho0 cells which lack mtDNA and which are routinely used as negative PCR quality control for clinical test developments. A faint amplification of mtDNA was observed, but was a result of amplification of known ancestral mtDNA fragments inserted in the Human nuclear genome, also known as NUMTS [72]. After comparing the difference in copy number of this pseudogene (i.e., one copy per cell) versus mtDNA copies (i.e hundreds per cell), we considered this amplification negligible and validated our qPCR. Regarding the mtDNA deletion assay, the co-amplification of the nuclear pseudogene generated an estimated error of 1%. qPCR revealed rates of deleted mtDNA in the blood from patients affected by such mtDNA deletions ($n = 3$) consistent with those observed by the French national reference center. DBS from healthy newborns ($n = 10$) were also tested with our qPCR and showed an average rate of deletion of $1.1\% \pm 0.4$, consistent with the error previously calculated. The assay was qualitative and children were considered positive if the MDD was superior or equal to a threshold of 2.3%, corresponding to mean + 3 *standard deviation, obtained from these healthy newborns.

References

1. World Health Organization. *Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach*, 2nd ed.; World Health Organization Press: Geneva, Switzerland, 2016; ISBN 978-92-4-154968-4.
2. Ramírez-Ramírez, A.; Sánchez-Serrano, E.; Loaiza-Flores, G.; Plazola-Camacho, N.; Rodríguez-Delgado, R.G.; Figueroa-Damián, R.; Domínguez-Castro, M.; López-Martínez, M.; Flores-García, Z.; Hernández-Pineda, J. Simultaneous quantification of four antiretroviral drugs in breast milk samples from HIV-positive women by an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Waitt, C.; Diliy Penchala, S.; Olagunju, A.; Amara, A.; Else, L.; Lamorde, M.; Khoo, S. Development, validation and clinical application of a method for the simultaneous quantification of lamivudine, emtricitabine and tenofovir in dried blood and dried breast milk spots using LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1060*, 300–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Salado-Rasmussen, K.; Theilgaard, Z.P.; Chiduo, M.G.; Bygbjerg, I.C.; Gerstoft, J.; Lüneborg-Nielsen, M.; Lemnge, M.; Katzenstein, T.L. Nevirapine, sodium concentration and HIV-1 RNA in breast milk and plasma among HIV-infected women receiving short-course antiretroviral prophylaxis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mugwanya, K.K.; Hendrix, C.W.; Mugo, N.R.; Marzinke, M.; Katabira, E.T.; Ngure, K.; Semiyaga, N.B.; John-Stewart, G.; Muwonge, T.R.; Muthuri, G.; et al. Pre-exposure prophylaxis use by breastfeeding HIV-uninfected women: A prospective short-term study of antiretroviral excretion in breast milk and infant absorption. *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1002132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. UNAIDS. Available online: <http://aidsinfo.unaids.org/> (accessed on 27 July 2020).
7. Williams, P.L.; Hazra, R.; Van Dyke, R.B.; Yildirim, C.; Crain, M.J.; Seage, G.R.; Civitello, L.; Ellis, A.; Butler, L.; Pediatric HIV/AIDS cohort study. Antiretroviral exposure during pregnancy and adverse outcomes in HIV-exposed uninfected infants and children using a trigger-based design. *AIDS* **2016**, *30*, 133–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Simon, A.; Warszawski, J.; Kariyawasam, D.; Le Chenadec, J.; Benhammou, V.; Czernichow, P.; Foissac, F.; Laborde, K.; Tréluyer, J.-M.; Firtion, G. Association of prenatal and postnatal exposure to lopinavir-ritonavir and adrenal dysfunction among uninfected infants of HIV-infected mothers. *JAMA* **2011**, *306*, 70–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Newell, M.-L.; Coovadia, H.; Cortina-Borja, M.; Rollins, N.; Gaillard, P.; Dabis, F. Ghent international AIDS society (IAS) working group on HIV infection in women and children. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: A pooled analysis. *Lancet* **2004**, *364*, 1236–1243. [[CrossRef](#)]
10. Taron-Brocard, C.; Le Chenadec, J.; Faye, A.; Dollfus, C.; Goetghebuer, T.; Gajdos, V.; Labaune, J.-M.; Perilhou, A.; Mandelbrot, L.; France REcherche Nord&Sud sida-HIV hepatitis—Enquete perinatale Francaise—CO1/CO11 study group; et al. Increased risk of serious bacterial infections due to maternal immunosuppression in HIV-exposed uninfected infants in a European country. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59*, 1332–1345. [[CrossRef](#)]
11. Arikawa, S.; Rollins, N.; Newell, M.-L.; Becquet, R. Mortality risk and associated factors in HIV-exposed, uninfected children. *Trop. Med. Int. Health* **2016**, *21*, 720–734. [[CrossRef](#)]
12. Brennan, A.T.; Bonawitz, R.; Gill, C.J.; Thea, D.M.; Kleinman, M.; Useem, J.; Garrison, L.; Ceccarelli, R.; Udokwu, C.; Long, L.; et al. A meta-analysis assessing all-cause mortality in HIV-exposed uninfected compared with HIV-unexposed uninfected infants and children. *AIDS* **2016**, *30*, 2351–2360. [[CrossRef](#)]
13. Omoni, A.O.; Ntozini, R.; Evans, C.; Prendergast, A.J.; Moulton, L.H.; Christian, P.S.; Humphrey, J.H. Child growth according to maternal and child HIV status in Zimbabwe. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 869–876. [[CrossRef](#)]
14. Uthman, O.A.; Nachega, J.B.; Anderson, J.; Kanters, S.; Mills, E.J.; Renaud, F.; Essajee, S.; Doherty, M.C.; Mofenson, L.M. Timing of initiation of antiretroviral therapy and adverse pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV* **2017**, *4*, e21–e30. [[CrossRef](#)]
15. Le Roux, S.M.; Abrams, E.J.; Donald, K.A.; Brittain, K.; Phillips, T.K.; Nguyen, K.K.; Zerbe, A.; Kroon, M.; Myer, L. Growth trajectories of breastfed HIV-exposed uninfected and HIV-unexposed children under conditions of universal maternal antiretroviral therapy: A prospective study. *Lancet Child Adolesc. Health* **2019**, *3*, 234–244. [[CrossRef](#)]
16. Blanche, S.; Tylleskär, T.; Peries, M.; Kankasa, C.; Engebretsen, I.; Meda, N.; Tumwine, J.K.; Singata-Madliki, M.; Mwiya, M.; Van de Perre, P.; et al. Growth in HIV-1-exposed but uninfected infants treated with lopinavir-ritonavir versus lamivudine: A secondary analysis of the ANRS 12174 trial. *Lancet HIV* **2019**, *6*, e307–e314. [[CrossRef](#)]
17. Wedderburn, C.J.; Evans, C.; Yeung, S.; Gibb, D.M.; Donald, K.A.; Prendergast, A.J. Growth and neurodevelopment of HIV-exposed uninfected children: A conceptual framework. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **2019**, *16*, 501–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Powis, K.M.; Smeaton, L.; Hughes, M.D.; Tumbare, E.A.; Souda, S.; Jao, J.; Wirth, K.E.; Makhema, J.; Lockman, S.; Fawzi, W.; et al. In-utero triple antiretroviral exposure associated with decreased growth among HIV-exposed uninfected infants in Botswana. *AIDS* **2016**, *30*, 211–220. [[CrossRef](#)]

19. McHenry, M.S.; McAteer, C.I.; Oyungu, E.; McDonald, B.C.; Bosma, C.B.; Mpofo, P.B.; Deathe, A.R.; Vreeman, R.C. Neurodevelopment in young children born to HIV-infected mothers: A meta-analysis. *Pediatrics* **2018**, *141*, e20172888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Le Roux, S.M.; Donald, K.A.; Brittain, K.; Phillips, T.K.; Zerbe, A.; Nguyen, K.K.; Strandvik, A.; Kroon, M.; Abrams, E.J.; Myer, L. Neurodevelopment of breastfed HIV-exposed uninfected and HIV-unexposed children in South Africa. *AIDS* **2018**, *32*, 1781–1791. [[CrossRef](#)]
21. Wedderburn, C.J.; Yeung, S.; Rehman, A.M.; Stadler, J.A.M.; Nhapi, R.T.; Barnett, W.; Myer, L.; Gibb, D.M.; Zar, H.J.; Stein, D.J.; et al. Neurodevelopment of HIV-exposed uninfected children in South Africa: Outcomes from an observational birth cohort study. *Lancet Child Adolesc. Health* **2019**, *3*, 803–813. [[CrossRef](#)]
22. Bunders, M.; Pembrey, L.; Kuijpers, T.; Newell, M.-L. Evidence of impact of maternal HIV infection on immunoglobulin levels in HIV-exposed uninfected children. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2010**, *26*, 967–975. [[CrossRef](#)]
23. Reikie, B.A.; Adams, R.C.M.; Leligdowicz, A.; Ho, K.; Naidoo, S.; Ruck, C.E.; de Beer, C.; Preiser, W.; Cotton, M.F.; Speert, D.P.; et al. Altered innate immune development in HIV-exposed uninfected infants. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2014**, *66*, 245–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Afran, L.; Garcia Knight, M.; Nduati, E.; Urban, B.C.; Heyderman, R.S.; Rowland-Jones, S.L. HIV-exposed uninfected children: A growing population with a vulnerable immune system? *Clin. Exp. Immunol.* **2014**, *176*, 11–22. [[CrossRef](#)]
25. Gianesin, K.; Noguera-Julian, A.; Zanchetta, M.; Del Bianco, P.; Petrara, M.R.; Freguja, R.; Rampon, O.; Fortuny, C.; Camós, M.; Mozzo, E.; et al. Premature aging and immune senescence in HIV-infected children. *AIDS* **2016**, *30*, 1363–1373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Abu-Raya, B.; Kollmann, T.R.; Marchant, A.; MacGillivray, D.M. The immune system of HIV-exposed uninfected infants. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 383. [[CrossRef](#)]
27. Poirier, M.C.; Gibbons, A.T.; Rugeles, M.T.; Andre-Schmutz, I.; Blanche, S. Fetal consequences of maternal antiretroviral nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) use in human and non-human primate pregnancy. *Curr. Opin. Pediatr.* **2015**, *27*, 233–239. [[CrossRef](#)]
28. Noguera-Julian, A.; Morén, C.; Rovira, N.; Garrabou, G.; Catalán, M.; Sánchez, E.; Cardellach, F.; Miró, Ó.; Fortuny, C. Decreased mitochondrial function among healthy infants exposed to antiretrovirals during gestation, delivery and the neonatal period. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2015**, *34*, 1349–1354. [[CrossRef](#)]
29. Jao, J.; Powis, K.M.; Kirmse, B.; Yu, C.; Epie, F.; Nshom, E.; Abrams, E.J.; Sperling, R.S.; Leroith, D.; Geffner, M.E.; et al. Lower mitochondrial DNA and altered mitochondrial fuel metabolism in HIV-exposed uninfected infants in Cameroon. *AIDS* **2017**, *31*, 2475–2481. [[CrossRef](#)]
30. Eckard, A.R.; Kirk, S.E.; Hagood, N.L. Contemporary issues in pregnancy (and offspring) in the current HIV era. *Curr. HIV/AIDS Rep* **2019**, *16*, 492–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Powis, K.M.; Siberry, G.K. Optimising HIV antiretrovirals for mothers and infants. *Lancet HIV* **2019**, *6*, e272–e273. [[CrossRef](#)]
32. Koczor, C.A.; Lewis, W. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor toxicity and mitochondrial DNA. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2010**, *6*, 1493–1504. [[CrossRef](#)]
33. Margolis, A.M.; Heverling, H.; Pham, P.A.; Stolbach, A. A review of the toxicity of HIV medications. *J. Med. Toxicol.* **2014**, *10*, 26–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kakuda, T.N. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin. Ther.* **2000**, *22*, 685–708. [[CrossRef](#)]
35. Estaquier, J.; Lelièvre, J.-D.; Petit, F.; Brunner, T.; Moutouh-de Parseval, L.; Richman, D.D.; Ameisen, J.C.; Corbeil, J. Effects of antiretroviral drugs on human immunodeficiency virus type 1-induced CD4+ T-cell death. *J. Virol.* **2002**, *76*, 5966–5973. [[CrossRef](#)]
36. Tricarico, P.M.; De Oliveira Franca, R.F.; Pacor, S.; Ceglia, V.; Crovella, S.; Celsi, F. HIV protease inhibitors apoptotic effect in SH-SY5Y neuronal cell line. *Cell Physiol. Biochem.* **2016**, *39*, 1463–1470. [[CrossRef](#)]
37. Ganta, K.K.; Chaubey, B. Endoplasmic reticulum stress leads to mitochondria-mediated apoptosis in cells treated with anti-HIV protease inhibitor ritonavir. *Cell Biol. Toxicol.* **2019**, *35*, 189–204. [[CrossRef](#)]

38. Taura, M.; Kariya, R.; Kudo, E.; Goto, H.; Iwawaki, T.; Amano, M.; Suico, M.A.; Kai, H.; Mitsuya, H.; Okada, S. Comparative analysis of ER stress response into HIV protease inhibitors: Lopinavir but not darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 778–788. [[CrossRef](#)]
39. Xiang, T.; Du, L.; Pham, P.; Zhu, B.; Jiang, S. Nelfinavir, an HIV protease inhibitor, induces apoptosis and cell cycle arrest in human cervical cancer cells via the ROS-dependent mitochondrial pathway. *Cancer Lett.* **2015**, *364*, 79–88. [[CrossRef](#)]
40. Gratton, R.; Tricarico, P.M.; Guimaraes, R.L.; Celsi, F.; Crovella, S. Lopinavir/Ritonavir treatment induces oxidative stress and caspase independent apoptosis in human glioblastoma U-87 MG cell line. *Curr. HIV Res.* **2018**, *16*, 106–112. [[CrossRef](#)]
41. Morén, C.; Noguera-Julian, A.; Garrabou, G.; Catalán, M.; Rovira, N.; Tobías, E.; Cardellach, F.; Miró, Ò.; Fortuny, C. Mitochondrial evolution in HIV-infected children receiving first- or second-generation nucleoside analogues. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2012**, *60*, 111–116. [[CrossRef](#)]
42. Liu, K.; Sun, Y.; Liu, D.; Yin, J.; Qiao, L.; Shi, Y.; Dong, Y.; Li, N.; Zhang, F.; Chen, D. Mitochondrial toxicity studied with the PBMC of children from the Chinese national pediatric highly active antiretroviral therapy cohort. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57223. [[CrossRef](#)]
43. Shen, J.; Liberty, A.; Shiau, S.; Strehlau, R.; Pierson, S.; Patel, F.; Wang, L.; Burke, M.; Violari, A.; Coovadia, A.; et al. Mitochondrial impairment in well-suppressed children with perinatal HIV-infection on antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2019**, *36*, 27–38. [[CrossRef](#)]
44. Poirier, M.C.; Divi, R.L.; Al-Harthi, L.; Olivero, O.A.; Nguyen, V.; Walker, B.; Landay, A.L.; Walker, V.E.; Charurat, M.; Women and Infants Transmission Study (WITS) Group. Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2003**, *33*, 175–183. [[CrossRef](#)]
45. Divi, R.L.; Walker, V.E.; Wade, N.A.; Nagashima, K.; Seilkop, S.K.; Adams, M.E.; Nesel, C.J.; O’Neill, J.P.; Abrams, E.J.; Poirier, M.C. Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exposed in utero to Combivir. *AIDS* **2004**, *18*, 1013–1021. [[CrossRef](#)]
46. Divi, R.L.; Leonard, S.L.; Kuo, M.M.; Nagashima, K.; Thamire, C.; St. Claire, M.C.; Wade, N.A.; Walker, V.E.; Poirier, M.C. Transplacentally exposed human and monkey newborn infants show similar evidence of nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* **2007**, *48*, 201–209. [[CrossRef](#)]
47. Hernández, S.; Morén, C.; López, M.; Coll, O.; Cardellach, F.; Gratacós, E.; Miró, O.; Garrabou, G. Perinatal outcomes, mitochondrial toxicity and apoptosis in HIV-treated pregnant women and in-utero-exposed newborn. *AIDS* **2012**, *26*, 419–428. [[CrossRef](#)]
48. Aldrovandi, G.M.; Chu, C.; Shearer, W.T.; Li, D.; Walter, J.; Thompson, B.; McIntosh, K.; Foca, M.; Meyer, W.A.; Ha, B.F.; et al. Antiretroviral exposure and lymphocyte mtDNA content among uninfected infants of HIV-1-infected women. *Pediatrics* **2009**, *124*, e1189–e1197. [[CrossRef](#)]
49. McComsey, G.A.; Kang, M.; Ross, A.C.; Lebrecht, D.; Livingston, E.; Melvin, A.; Hitti, J.; Cohn, S.E.; Walker, U.A.; AIDS Clinical Trials Group A5084. Increased mtDNA levels without change in mitochondrial enzymes in peripheral blood mononuclear cells of infants born to HIV-infected mothers on antiretroviral therapy. *HIV Clin. Trials* **2008**, *9*, 126–136. [[CrossRef](#)]
50. Côté, H.C.F.; Raboud, J.; Bitnun, A.; Alimenti, A.; Money, D.M.; Maan, E.; Costei, A.; Gadawski, I.; Diong, C.; Read, S.; et al. Perinatal exposure to antiretroviral therapy is associated with increased blood mitochondrial DNA levels and decreased mitochondrial gene expression in infants. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 851–859. [[CrossRef](#)]
51. Ross, A.C.; Leong, T.; Avery, A.; Castillo-Duran, M.; Bonilla, H.; Lebrecht, D.; Walker, U.A.; Storer, N.; Labbato, D.; Khaitan, A.; et al. Effects of in utero antiretroviral exposure on mitochondrial DNA levels, mitochondrial function and oxidative stress. *HIV Med.* **2012**, *13*, 98–106. [[CrossRef](#)]
52. Ajaykumar, A.; Zhu, M.; Kakkar, F.; Brophy, J.; Bitnun, A.; Alimenti, A.; Soudeyns, H.; Saberi, S.; Albert, A.Y.K.; CIHR team in cellular aging and HIV comorbidities in women and children (CARMA); et al. Blood mitochondrial DNA levels remain elevated from birth to early life in children HIV-exposed uninfected exposed to combination antiretroviral therapy in utero. *J. Infect. Dis.* Online ahead of print. [[CrossRef](#)]
53. Schon, E.A.; DiMauro, S.; Hirano, M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 878–890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Kazachkova, N. Mitochondrial DNA damage patterns and aging: Revising the evidences for humans and mice. *Aging Dis.* **2013**, *4*, 337–350. [[CrossRef](#)]
55. Brogly, S.B.; DiMauro, S.; Van Dyke, R.B.; Williams, P.L.; Naini, A.; Libutti, D.E.; Choi, J.; Chung, M.; Gerschenson, M. Short communication: Transplacental nucleoside analogue exposure and mitochondrial parameters in HIV-uninfected children. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2011**, *27*, 777–783. [[CrossRef](#)]
56. Kunz, A.; von Wurmb-Schwark, N.; Sewangi, J.; Ziske, J.; Lau, I.; Mbezi, P.; Theuring, S.; Hauser, A.; Dugange, F.; Katerna, A.; et al. Zidovudine exposure in HIV-1 infected Tanzanian women increases mitochondrial DNA levels in placenta and umbilical cords. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41637. [[CrossRef](#)]
57. Nagot, N.; Kankasa, C.; Meda, N.; Hofmeyr, J.; Nikodem, C.; Tumwine, J.K.; Karamagi, C.; Sommerfelt, H.; Neveu, D.; PROMISE-PEP group; et al. Lopinavir/Ritonavir versus Lamivudine peri-exposure prophylaxis to prevent HIV-1 transmission by breastfeeding: The PROMISE-PEP trial Protocol ANRS 12174. *BMC Infect. Dis.* **2012**, *12*, 246. [[CrossRef](#)]
58. Nagot, N.; Kankasa, C.; Tumwine, J.K.; Meda, N.; Hofmeyr, G.J.; Vallo, R.; Mwiya, M.; Kwagala, M.; Traore, H.; Sunday, A.; et al. Extended pre-exposure prophylaxis with lopinavir-ritonavir versus lamivudine to prevent HIV-1 transmission through breastfeeding up to 50 weeks in infants in Africa (ANRS 12174): A randomised controlled trial. *Lancet* **2016**, *387*, 566–573. [[CrossRef](#)]
59. World Health Organization. *Antiretroviral Drugs for Treating Pregnant Women and Preventing HIV Infection in Infant: Towards Universal Access: Recommendations for a Public Health Approach*; World Health Organization Press: Geneva, Switzerland, 2006; ISBN 978-92-4-159466-0.
60. 2012–2013 SAPMTCTE Report. Early (4–8 Weeks Postpartum) Population-Level Effectiveness of WHO PMTCT Option A, South Africa. Available online: <https://www.samrc.ac.za/sites/default/files/files/2016-07-12/SAPMTCTEReport2012.pdf> (accessed on 25 August 2020).
61. Timmermans, E.C.; Tebas, P.; Ruiters, J.P.N.; Wanders, R.J.A.; de Ronde, A.; de Baar, M.P. Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay to quantify changes in mitochondrial DNA concentrations in cell cultures and blood cells from HIV-infected patients receiving antiviral therapy. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 979–987. [[CrossRef](#)]
62. Ashar, F.N.; Moes, A.; Moore, A.Z.; Grove, M.L.; Chaves, P.H.M.; Coresh, J.; Newman, A.B.; Matteini, A.M.; Bandeen-Roche, K.; Boerwinkle, E.; et al. Association of mitochondrial DNA levels with frailty and all-cause mortality. *J. Mol. Med.* **2015**, *93*, 177–186. [[CrossRef](#)]
63. Hurtado-Roca, Y.; Ledesma, M.; Gonzalez-Lazaro, M.; Moreno-Loshuertos, R.; Fernandez-Silva, P.; Enriquez, J.A.; Laclaustra, M. Adjusting MtDNA quantification in whole blood for peripheral blood platelet and leukocyte counts. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163770. [[CrossRef](#)]
64. Xia, C.-Y.; Liu, Y.; Yang, H.-R.; Yang, H.-Y.; Liu, J.-X.; Ma, Y.-N.; Qi, Y. Reference intervals of mitochondrial DNA copy number in peripheral blood for Chinese minors and adults. *Chin. Med. J.* **2017**, *130*, 2435–2440. [[CrossRef](#)]
65. Phillips, N.R.; Sprouse, M.L.; Roby, R.K. Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: A multiplex real-time PCR assay. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Smith, R.L.; Tan, J.M.E.; Jonker, M.J.; Jongejan, A.; Buissink, T.; Veldhuijzen, S.; van Kampen, A.H.C.; Brul, S.; van der Spek, H. Beyond the polymerase- γ theory: Production of ROS as a mode of NRTI-induced mitochondrial toxicity. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ventura-Clapier, R.; Moulin, M.; Piquereau, J.; Lemaire, C.; Mericskay, M.; Veksler, V.; Garnier, A. Mitochondria: A central target for sex differences in pathologies. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 803–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Maagaard, A.; Holberg-Petersen, M.; Kollberg, G.; Oldfors, A.; Sandvik, L.; Bruun, J.N. Mitochondrial (mt)DNA changes in tissue may not be reflected by depletion of mtDNA in peripheral blood mononuclear cells in HIV-infected patients. *Antivir. Ther.* **2006**, *11*, 601–608.
69. Lawless, C.; Greaves, L.; Reeve, A.K.; Turnbull, D.M.; Vincent, A.E. The rise and rise of mitochondrial DNA mutations. *Open Biol.* **2020**, *10*, 200061. [[CrossRef](#)]
70. Côté, H.C.F.; Brumme, Z.L.; Craib, K.J.P.; Alexander, C.S.; Wynhoven, B.; Ting, L.; Wong, H.; Harris, M.; Harrigan, P.R.; O’Shaughnessy, M.; et al. Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 811–820. [[CrossRef](#)]

71. Sun, J.; Longchamps, R.J.; Piggott, D.A.; Castellani, C.A.; Sumpter, J.A.; Brown, T.T.; Mehta, S.H.; Arking, D.E.; Kirk, G.D. Association between HIV infection and mitochondrial DNA copy number in peripheral blood: A population-based, prospective cohort study. *J. Infect. Dis.* **2019**, *219*, 1285–1293. [[CrossRef](#)]
72. Tourmen, Y.; Baris, O.; Dessen, P.; Jacques, C.; Malthièry, Y.; Reynier, P. Structure and chromosomal distribution of human mitochondrial pseudogenes. *Genomics* **2002**, *80*, 71–77. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article 2

« *Health outcomes at school age among children who are HIV-exposed but uninfected with detected mitochondrial DNA depletion at one year* »

Cette deuxième partie décrit l'évaluation sur le long terme de la toxicité mitochondriale des deux prophylaxies ARV, 3TC et LPV/r, administrées aux CHEU de l'essai PROMISE PEP. Contrairement au premier article évaluant la toxicité mitochondriale aiguë, celui-ci repose uniquement sur le nombre de copies d'ADNmt. Nous avons en effet souhaité développer notre collaboration avec le Centre Hospitalier Universitaire d'Angers afin de proposer une analyse quantitative du pourcentage de molécule d'ADNmt délétées dans le sang total des CHEU. Ce travail est en cours. Nous avons par ailleurs dans cette deuxième partie recherché une éventuelle association entre la déplétion de l'ADNmt observée à la fin de l'exposition aux ARV et la santé de ces enfants.

Ce suivi longitudinal a été rendu possible grâce à l'essai ANRS 12341 PROMISE M&S (ClinicalTrials.gov : NCT03519503) mené entre 2017 et 2018 qui a consisté à rappeler les CHEU de l'essai PROMISE PEP à l'âge de 6 ans, lors d'une visite sur un ou deux jours, pour une évaluation de leur croissance et de leur développement neuro-psychomoteur. Les résultats de cette étude menée par notre *consortium* sont en cours de révision dans *Scientific Reports*. Parmi les 1273 enfants inclus dans l'essai initial, 1101 étaient éligibles à l'essai PROMISE M&S après exclusion des enfants ne répondant pas aux critères d'éligibilité, à savoir 159 enfants n'ayant pas effectué la visite à W50, 11 enfants infectés et 2 à statut VIH inconnu. 562 enfants ont été inclus dans PROMISE M&S (50.2%). En effet, 339 mères ou responsables légal n'ont pas pu être contactés, 80 mères avaient déménagé, 60 mères n'avaient pas d'information de contact valide, 41 mères n'ont pas souhaité participer, 8 enfants sont décédés entre la visite à W50 et la visite à Y6, et 1 mère ne s'est pas présentée à la visite d'inclusion. La comparaison des caractéristiques des enfants inclus versus non inclus montrent que les enfants non-inscrits dans la cohorte de suivi avaient des z-scores à W50 (WAZ, HAZ et WHZ) plus faibles que ceux qui étaient inscrits, mais cela est dû au fait que les pays ayant les z-scores moyens les plus faibles (Burkina Faso et Zambie) avaient également les taux de recrutement les plus bas en raison de problèmes techniques et de personnel. Cependant, lorsque la comparaison est effectuée pays par pays ou ajustée par pays, les enfants inscrits et non-inscrits avaient des z-scores similaires. Au final, 553 enfants ont été inclus dans les analyses après exclusion de 8 infections et d'une violation de protocole. Si la prise de poids à un an était légèrement plus

faible parmi les CHEU ayant reçu du LPV/r en comparaison à ceux ayant reçu du 3TC, les conclusions à 6 ans sont plutôt rassurantes, montrant une croissance similaire des enfants entre les deux régimes prophylactiques, ainsi que des performances neuro-psychomotrices comparables.

Plusieurs stratégies d'analyse étaient envisageables pour l'étude de la toxicité mitochondriale sur le long terme. Nous aurions pu mener une étude rétrospective en se concentrant sur les CHEU présentant des signes majeurs de retard de croissance ou du développement neurocognitif à 6 ans et en analysant leur association avec les paramètres mitochondriaux entre D7 et W50. Nous avons cependant fait le choix de nous concentrer sur ceux présentant une déplétion de l'ADNmt à la fin de l'exposition aux ARV et d'évaluer ainsi de façon prospective leur état de santé à 6 ans. Ce choix s'inscrit en toute logique dans l'objectif décrit pour le premier article, à savoir la recherche d'éventuelles manifestations cliniques chez les CHEU dont le nombre de copies d'ADNmt se trouvait fortement altéré mais aussi dans notre objectif plus général d'identifier au plus tôt ceux dont la santé pourrait se trouver impactée sur le long terme pour pouvoir leur proposer un suivi adapté.

Ce travail est présenté dans l'article 2 qui suit ; les Supplementary Materials sont disponibles en Annexes.



Article

Health Outcomes at School Age among Children Who Are HIV-Exposed but Uninfected with Detected Mitochondrial DNA Depletion at One Year

Audrey Monnin ^{1,*} , Nicolas Nagot ², Sabrina Eymard-Duvernay ¹, Nicolas Meda ³, James K. Tumwine ⁴, Thorkild Tylleskär ⁵ , Philippe Van de Perre ² and Jean-Pierre Molès ¹

¹ Pathogenèse et Contrôle des Infections Chroniques, INSERM U1058, Université Montpellier, Etablissement Français du Sang, 34934 Montpellier, France; sabrina.eynard-duvernay@ird.fr (S.E.-D.); jean-pierre.moles@inserm.fr (J.-P.M.)

² Pathogenèse et Contrôle des Infections Chroniques, INSERM U1058, Université Montpellier, Centre Hospitalier Universitaire, 34934 Montpellier, France; n-nagot@chu-montpellier.fr (N.N.); p-van_de_perre@chu-montpellier.fr (P.V.d.P.)

³ Centre MURAZ, Bobo-Dioulasso 01 01 B.P. 390, Burkina Faso; nicolas.meda@gmail.com

⁴ Department of Paediatrics and Child Health, School of Medicine, College of Health Sciences, Makerere University, Kampala 7062, Uganda; kabaleimc@gmail.com

⁵ Centre for International Health, Faculty of Medicine, University of Bergen, 5009 Bergen, Norway; thorkild.tylleskar@uib.no

* Correspondence: audrey.monnin@inserm.fr; Tel.: +33-434-359-120

Received: 5 October 2020; Accepted: 12 November 2020; Published: 16 November 2020



Abstract: Infant antiretroviral (ARV) prophylaxis given to children who are human immunodeficiency virus (HIV)-exposed but uninfected (CHEU) to prevent HIV transmission through breastfeeding previously proved its efficacy in the fight against the pediatric epidemic. However, few studies have investigated the short- and long-term safety of prophylactic regimens. We previously reported a decrease of mitochondrial DNA (mtDNA) content among CHEU who received one year of lamivudine (3TC) or lopinavir-boosted ritonavir (LPV/r) as infant prophylaxis. We aimed to describe mtDNA content at six years of age among these CHEU, including those for whom we identified mtDNA depletion at week 50 (decrease superior or equal to 50% from baseline), and to compare the two prophylactic drugs. We also addressed the association between mtDNA depletion at week 50 with growth, clinical, and neuropsychological outcomes at year 6. Quantitative PCR was used to measure mtDNA content in whole blood of CHEU seven days after birth, at week 50, and at year 6. Among CHEU with identified mtDNA depletion at week 50 ($n = 17$), only one had a persistent mtDNA content decrease at year 6. No difference between prophylactic drugs was observed. mtDNA depletion was not associated with growth, clinical, or neuropsychological outcomes at year 6. This study brought reassuring data concerning the safety of infant 3TC or LPV/r prophylaxis.

Keywords: mitochondrial DNA; depletion; HIV-exposed uninfected children; lopinavir/ritonavir; lamivudine; growth; neurodevelopment; breastfeeding; Africa

1. Introduction

In 2019, pediatric human immunodeficiency virus (HIV) infections accounted for about 9% of all new HIV infections worldwide, 90% of which were in sub-Saharan African countries [1]. According to the last 2020 report from the “Start free. Stay free. AIDS Free.” program, postnatal transmission of HIV accounted for 46% of new HIV infections in infants among 21 priority countries defined by the WHO in 2011 [2]. HIV transmission to infants during breastfeeding is mainly explained by the lack of adherence

to the maternal antiretroviral (ARV) treatment or the absence of treatment [2,3]. Although considerable progress in accessing viral load and antiretroviral therapy has been made in many countries, with 85% of HIV pregnant women receiving ARV, efforts need to be reinforced in order to achieve the elimination of all postnatal transmission by 2030 [1].

All countries are now implementing a combination of universal maternal ARV treatments and children who are HIV-exposed but uninfected (CHEU) receive a prophylaxis using nevirapine (NVP) for 6 weeks in order to prevent mother-to-child transmission (MTCT) of HIV during breastfeeding [4]. Easier access to HIV viral load further improves this strategy by extending infant prophylaxis when breastfeeding mothers have an uncontrolled viral load. The type and duration of ARV prophylaxis given to breastfed CHEU was mostly empirical, monotherapy with NVP for 6 weeks within the current guidelines [4], dual therapy of zidovudine (AZT) plus NVP for 12 weeks at most for children who are at risk of acquiring HIV [4], or triple therapy (AZT/lamivudine (3TC)/NVP) as per Zambian guidelines for at least 12 weeks and to be stopped if the mother's viral load is controlled, otherwise continued until a controlled viral load is reached, or four weeks after the cessation of breastfeeding [5].

Though the efficacy of infant prophylaxis has been demonstrated, few safety studies have been reported, especially considering that this additional ARV exposition applies to children who already show poorer health outcomes compared to children who are HIV-unexposed and uninfected (CHUU) [6]. A recent sub-analysis from the HIV Prevention Trials Network (HPTN) 046 trial study reported the safety profile of the extended prophylactic use of NVP from 6 weeks to 6 months on growth among breastfed CHEU followed until 18 months of age in comparison to CHEU receiving the current 6 weeks NVP recommendation [7]. Although standardized growth indicators (weight-for-age Z-score (WAZ), length-for-age Z-score, weight-for-length Z-score, and head circumference Z-score) declined over time in both groups of children compared to the general population, authors did not observe impaired growth in CHEU receiving the extended prophylaxis when compared to those receiving the standard NVP prophylaxis. CHEU receiving lopinavir/ritonavir (LPV/r) prophylaxis for one year in the PROMISE PEP trial exhibited stunted growth compared to those who received lamivudine (3TC) but normalized indicators at 6 years old [8]. They also showed an earlier asymptomatic adrenal dysfunction [9]. Furthermore, despite debates regarding neurological outcomes among CHEU, a recent study reported no neurodevelopmental differences between CHEU receiving NVP prophylaxis when compared to CHUU children in the first 60 months [10].

To date, there is no clear understanding of the underlying mechanisms that bring forward these key health differences, between CHEU and CHUU, and between CHEU receiving ARV prophylaxis or not. Previous works have reported differences in mitochondrial DNA (mtDNA) alterations such as a lower number of mtDNA copies per cell mainly resulting from the ARV exposure [11–15]. We recently reported altered mtDNA parameters among CHEU who received one year of 3TC or LPV/r monoprophyllaxis [16]. More specifically, this acute toxicity is expressed by an mtDNA depletion (50% decrease of mtDNA content from baseline) at 6 months in comparison to CHEU who did not receive a prophylaxis. Whether this decrease of mtDNA content persists over time after discontinuation of ARV exposure remains less documented. Studies focusing on CHEU who did not receive ARV prophylaxis reported an increase or no change of mtDNA content at two years, but levels of mtDNA remained very low compared to that of HIV-unexposed children [11,15]. Only one U.S. cohort study was able to observe a recovery of mtDNA content at 5 years of age similar to control children [15]. The *Erythrocebus patas* monkey model is not reassuring regarding this point. Monkey offspring that were HIV-uninfected but exposed in utero to ARV showed progressive mtDNA depletion in the brain cortex from birth to one year (equivalent to 5 years for humans) for those exposed to AZT/3TC, AZT/didanosine (ddI), or d4T/3TC and compromised mitochondrial morphology at one and three years old (equivalent to 15 years old in humans) [17]. The latter finding raised concern for the neurodevelopment of CHEU treated or exposed to ARV who presented motor, cognitive, and language delays at one and two years of age as well as growth impairment in comparison with CHUU [18,19].

The objectives of our study were to describe at school age the mtDNA content from seven days of life to six years of age among CHEU who had received a one year LPV/r or 3TC prophylaxis, including those with previously reported mtDNA depletion at the end of the prophylaxis, and to compare the two drug regimens. We also addressed the association between mtDNA depletion at week 50 and growth, clinical, and neuropsychological outcomes at year 6.

2. Experimental Section

2.1. Study Design and Settings

The study is designed as an observational cross-sectional study, which recalled CHEU from Burkina Faso and Uganda between February 2017 and February 2018, who completed the final visit of the PROMISE PEP trial (NCT00640263) 5 years ago. Children, as well as their mothers or caregivers, were invited to the study site for a one or two day visit for a growth, clinical, and neuropsychological evaluation (PROMISE M&S trial, NCT03519503). Prior to enrollment, inclusion criteria were verified and the mother or legal guardian signed an informed consent form. The visit consisted of a consultation with a medical doctor and a psychologist [20].

2.2. Study Population

This study included CHEU who previously participated between November 2009 and May 2012 in the evaluation of the safety and the efficacy of LPV/r and 3TC pediatric formulations used as pre-exposure prophylaxis (PrEP) to prevent HIV acquisition during breastfeeding (PROMISE PEP trial) [21,22]. This includes CHEU from Burkina Faso, South Africa, Uganda, and Zambia who were randomly selected seven days after birth to receive either LPV/r or 3TC until one week after the cessation of breastfeeding, with a maximum duration of fifty weeks. Mothers were not eligible for an ARV treatment at the time of the trial (>350 CD4+ cells/mm³) but received ARV prophylaxis during pregnancy and labor as per national guidelines for the prevention of MTCT of HIV [23]. Children were eligible if they had available dried blood spots at day 7, week 50, and year 6. We randomly selected a total of 100 children from Burkina Faso and from Uganda with a 1:1 ratio of male and female children and a 1:1 ratio of 3TC and LPV/r prophylaxis in a two-step process; the first one selecting participants from the previous study evaluating the acute mitochondrial toxicity of the PrEP regimen [16] and a second one that completed the selection. Zambian and South African CHEU were not included in the present study because we had previously shown that mitochondrial parameters from whole blood interacted with platelet count and because the protocol did not include a blood sample repository, respectively.

2.3. Sample Collection and Processing

Capillary blood samples at day 7 and week 50 were collected by a heel prick directly on Whatman 903 cards. Venous blood collected in EDTA tubes were used for dried blood spot processing at year 6. All cards were stored with desiccant in a zipped pouch at -20 °C at the study sites. DNA extraction was performed from 3 mm diameter punches ($n = 3$) using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturers' instructions. Extracted DNA was stored at -80 °C.

2.4. Neuropsychological Assessments

The Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ-25) was used to identify mental health symptoms and included five scales of questions based on emotional problems, conduct problems, hyper activity, peer relationship problems, and prosocial behavior. The Test of Variable of Attention (TOVA) was used to measure attention and impulsivity in children. The Movement Assessment Battery for Children, second edition (MABC-2) was used to evaluate impairments in motor performance including manual dexterity, aiming and catching, and balance. The Kaufman Assessment Battery for Children, second edition (KABC-II) was used to evaluate cognitive abilities including sequential

processing, simultaneous processing, and learning. Methodology for scores analysis and main findings are described elsewhere [20].

2.5. Mitochondrial DNA Copy Number per Cell Assay

mtDNA copy number per cell (MCN) was measured using two independent quantitative polymerase chain reactions using the QuickScan™ Mitox assay (Primagen, Amsterdam, The Netherlands) on a LightCycler® 480 (Roche, Bâle, Switzerland) instrument [24], and was expressed as the ratio between mtDNA copy number of the *RNR2* gene and the copy number of the single-copy nuclear *SNRPA* gene. The sequences of the primers used were the following: for *RNR2* gene, forward 5'-GGGCTCTGCCATCTTAA-3' and reverse 5'-GTAATCCAGGTCGGTTTCTA-3'; and for *SNRPA* gene, forward 5'-CGGCATGTGGTGCATAA-3' and reverse 5'-TGCGCCTCTTTCTGGGTGTT-3'. The detailed protocol was previously described [16,24].

At each time point, we applied a stringent quality control of DNA (for details see [16]) by: (i) removing data with a cycle threshold (Ct) for *SNRPA* not comprised between the mean of all the Ct \pm 2 standard deviations in order to filter for nuclear DNA degradation as previously reported [16,25], and (ii) by accounting for platelets and leucocytes counts because the MCN was quantified from whole blood. Platelet count correlation with MCN was assessed using Spearman's rank order correlation test (if the absolute value of Rho was ≥ 0.3 with $p \leq 0.05$, the site was excluded from the analysis). We also applied the formula of Hurtado allowing MCN adjustment on peripheral platelet and leucocyte counts [26]. If the difference between the raw and corrected data did not exceed 10%, the raw data were validated.

2.6. Statistical Analysis

Data are presented as means with their standard deviation (SD) or as medians with their interquartile range ([IQR]) for Gaussian or non-Gaussian continuous variables, respectively, and as frequencies with percentages for categorical variables.

In order to estimate a potential selection bias, we compared the characteristics of CHEU not including those enrolled in the study using chi-squared or Fisher's exact tests as appropriate for categorical variables, and Student's *t*-test or Wilcoxon Mann–Whitney test for continuous variables. Similarly, we compared the characteristics of CHEU with mtDNA depletion versus those without mtDNA depletion.

We compared MCN between the two prophylactic drugs and MCN between sites using the Wilcoxon Mann–Whitney test. Wilcoxon signed-rank test was used to compare MCN at day 7 and at week 50, and MCN at week 50 and at year 6. Differences in MCN between day 7 and week 50 and between week 50 and year 6 were compared between the two prophylactic drugs using Wilcoxon Mann–Whitney test. We used the chi-squared test to compare the proportion of CHEU with mtDNA depletion, defined as a 50% decrease of MCN at week 50 from its day 7 baseline value [16], between prophylactic drug regimens and between sites.

The association between mtDNA depletion at week 50 and growth indicators (WAZ, height-for-age Z-score (HAZ), and body mass index z-score (BMIZ)), neuropsychological test scores (SQD-25, TOVA, MABC-2, KABC-II), or hematological outcomes (platelet count) at year 6 was assessed using linear regression models. Global scores for three neuropsychological tests were used, and SDQ-25 questionnaire scores were square transformed to obtain a normal distribution. The association between mtDNA depletion at week 50 and "having a clinical or hospital consultation during the last years" or "having an abnormal lactate dehydrogenase (LDH) concentration at year 6" was assessed using log-binomial regressions. Analyses were adjusted for the gender of the child and the prophylactic drug.

Statistical analyses were performed using SAS studio (Copyright © 2012–2020 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The forest plot was drawn using GraphPad software 7.0 (Copyright © 1992–2018).

2.7. Ethics Consideration

Written informed consents were obtained from the mother or the legal representative prior to enrollment in the PROMISE PEP trial (NCT00640263) and in PROMISE M&S trial (NCT03519503). The protocols were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethical Committee for Health Research in Burkina Faso (#2008-039 and #2016-4-41) and the Uganda National Council for Science and Technology (#HS 470 and #HS1988).

3. Results

3.1. Study Population and Characteristics

The final study population after quality control assessment (see Result details in the Supplementary Materials) consisted of 86 CHEU with a median age of 6 years, equally distributed between both sites (Table 1). The male:female and prophylactic regimen (3TC:LPV/r) ratios were both approximately 1. The majority of children had normal growth indicators but severe-to-moderate stunting, wasting, and underweight were observed for 2 (2.4%), 4 (4.7%), and 3 (3.5%) children, respectively. The hematological parameters were normal for all children except 6 cases of anemia (7.0%) and 2 cases of neutropenia (2.3%). More than 97% of children had normal alanine aminotransferase (ALT) concentration, but LDH concentration was abnormal for 2/3 of children. Medical consultations since week 50 were also monitored. The characteristics of children enrolled in the study did not differ from those who were not enrolled except they had higher weights, heights, and SDQ-25 scores (Supplementary Table S1).

Table 1. Characteristics of children who are human immunodeficiency virus (HIV)-exposed but uninfected (CHEU) enrolled in the study.

Characteristic	CHEU Enrolled (n = 86)
Sociodemographics	
Age (in years); median [IQR]	6.0 [5.0–6.0]
Site; n (%)	
Burkina Faso	43 (50.0)
Uganda	43 (50.0)
Gender; n (%)	
Male	44 (51.2)
Anthropometrics; mean ± SD	
Weight (kg)	19.9 ± 2.9 †
Height (cm)	115.7 ± 6.2 †
WAZ	−0.5 ± 0.9 †
HAZ	−0.3 ± 1.0 †
BMIZ	−0.4 ± 0.9 †
Hematology	
Hemoglobin concentration (g/dL); n (%)	
Normal > 10.4	80 (93.0)
Anemia ≤ 10.4	6 (7.0)
Mild [10.4–9.5]	5 (5.8)
Moderate [9.5–8.5]	1 (1.2)
Platelet count (10 ³ /mm ³); mean ± SD	358.4 ± 110.2
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)	
Normal > 125	86 (100.0)
Leucocyte count (10 ³ /mm ³); n (%)	
Normal > 2.5	86 (100.0)

Table 1. Cont.

Characteristic	CHEU Enrolled (n = 86)
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)	
Normal > 1.0	84 (97.7)
Neutropenia ≤ 1.0	2 (2.3)
Mild [1.0–0.79]	2 (2.3)
Biochemistry; n (%)	
LDH concentration (×ULN)	
Normal < ULN	27 (31.4)
Abnormal ≥ ULN	59 (68.6)
Mild [ULN–2 × ULN]	59 (68.6)
ALT concentration (U/L)	
Normal < 1.25 × ULN	84 (97.7)
Abnormal ≥ 1.25 × ULN	2 (2.3)
Mild [1.25–2.5] × ULN	1 (1.16)
Moderate [2.5–5.0] × ULN	1 (1.16)
Medical events; n (%)	
Clinical consultation without admission during the last year	
Yes	56 (65.9) [†]
Hospital admission since week 50	
Yes	26 (31.3) [§]
Child ARV prophylaxis	
Lamivudine	41 (47.7)
Lopinavir/ritonavir	45 (52.3)
Neuropsychological assessment	
SDQ-25; median [IQR]	6.0 [3.0;9.0] [†]
TOVA; mean ± SD	2.2 ± 0.8 [£]
MABC-2; mean ± SD	78.2 ± 10.7 [§]
KABC-II; mean ± SD	48.9 ± 12.9 [§]

[†] One missing value, [£] nine missing values, [§] three missing values. Abbreviations: CHEU, children who are HIV-exposed but uninfected; IQR, interquartile range; SD, standard deviation; WAZ, weight-for-age z-score; HAZ, height-for-age z-score; BMIZ, body mass index z-score; LDH, lactate dehydrogenase; ALT, alanine aminotransferase; ULN, under limit of normal; ARV, antiretroviral; SDQ-25, Strengths and Difficulties Questionnaire; TOVA, Test of Variable of Attention; MABC-2, Movement Assessment Battery for Children—second edition; KABC-II, Kaufman Assessment Battery for Children—second edition.

3.2. Overall mtDNA Content

At baseline, MCN was similar between treatment groups ($p = 0.41$) and between sites ($p = 0.67$), with a median MCN of 1082 and an interquartile range of [938;1253] (Table 2). At week 50, MCN showed a decreasing trend as compared to the matched baseline value ($p = 0.23$), with a median of 913 [655;1218] followed by an increase at year 6 ($p = 0.10$), ending up with a median of 955 [771;1192] at the end of the follow-up. No difference between treatment groups or between study sites was observed at week 50 ($p = 0.42$ and $p = 0.86$, respectively) and at year 6 ($p = 0.37$ and $p = 0.29$, respectively). The overall dynamic of mtDNA content is further described in Supplementary Table S2.

3.3. Mitochondrial DNA Depletion during the Follow-Up for CHEU

Because we previously reported a high frequency of children with mtDNA depletion at the end of the prophylaxis [16], we decided to focus on this specific population for the follow-up study. Characteristics of CHEU with or without mtDNA depletion were similar at year 6. Of note, more than 80% of CHEU with depletion presented an abnormal LDH concentration at year 6.

Table 2. Mitochondrial DNA content at baseline, week 50, and year 6.

Follow-Up Time Point	PrEP	Burkina Faso		Uganda		All	
		<i>n</i>	Median MCN [IQR]	<i>n</i>	Median MCN [IQR]	<i>n</i>	Median MCN [IQR]
day 7	3TC	20	1014 [856;1415]	21	1083 [950;1145]	41	1083 [950;1145]
	LPV/r	23	1061 [938;1436]	22	1084 [992;1198]	45	1084 [992;1198]
	All	43	1053 [898;1436]	43	1083 [960;1180]	86	1082 [938;1253]
week 50	3TC	20	861 [658;1183]	21	888 [470;1209]	41	868 [603;1192]
	LPV/r	23	908 [710;1300]	22	993 [742;1319]	45	972 [742;1300]
	All	43	876 [660;1192]	43	972 [563;1261]	86	913 [655;1218]
year 6	3TC	20	847 [620;1079]	21	1124 [836;1183]	41	926 [717;1157]
	LPV/r	23	997 [720;1389]	22	957 [812;1182]	45	960 [801;1279]
	All	43	904 [689;1157]	43	976 [812;1183]	86	955 [771;1192]

Abbreviations: PrEP, pre-exposure prophylaxis; MCN, mitochondrial DNA copy number per cell; IQR, interquartile range; 3TC, lamivudine; LPV/r, lopinavir/ritonavir.

Among the 51 CHEU showing a decrease of MCN at week 50 out of the 86 CHEU analyzed (Supplementary Table S2), 17 cases (19.8%) of mtDNA depletion at W50 were reported, 11 in the 3TC arm (64.7%) and 6 in the LPV/r arm (35.3%) ($p = 0.12$) (Table 3). Cases of mtDNA depletion were nearly equally distributed among Burkina Faso and Uganda ($p = 0.79$). At year 6, all but one child with depletion at week 50 (94.1%) increased their MCN ($p < 0.001$; Table 3). Of these, 5 had an MCN above their baseline value with a median MCN of 1279 [926;1389] and 11 had an MCN below their baseline value with a median MCN of 808 [611;1294]. MCN increase from week 50 to year 6 was similar between treatment groups ($p = 0.96$). Of note, there was no difference between CHEU with mtDNA depletion between the PROMISE PEP and PROMISE M&S trials (Supplementary Table S3).

Table 3. Mitochondrial DNA depletion among CHEU by time point.

Follow-Up Time Point	Group	PrEP	Burkina Faso	Uganda	All
			<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
week 50	Depletion of mtDNA at week 50	3TC	5 (55.6)	6 (75.0)	11 (64.7)
		LPV/r	4 (44.4)	2 (25.0)	6 (35.3)
		All	9 (52.9)	8 (47.1)	17 (100.0)
year 6	Increase of MCN at year 6 from week 50	3TC	4 (50.0)	6 (75.0)	10 (62.5)
		LPV/r	4 (50.0)	2 (25.0)	6 (37.5)
		All	8 (50.0)	8 (50.0)	16 (100.0)
	Decrease of MCN at year 6 from week 50	3TC	1 (100.0)	0	1 (100.0)
		LPV/r	0	0	0
		All	1 (100.0)	0	1 (100.0)

Abbreviations: mtDNA, mitochondrial DNA; PrEP, pre-exposure prophylaxis; 3TC, lamivudine; LPV/r, lopinavir/ritonavir.

3.4. Growth, Clinical, and Neuropsychological Outcomes at Year 6 among CHEU with mtDNA Depletion

Linear regressions showed that mtDNA depletion at week 50 was not associated with poor growth outcomes (WAZ, HAZ, BMIZ), nor was it associated with lower scores on the neuropsychological tests or the platelet count at year 6 (Figure 1). Log-binomial regressions showed that mtDNA depletion was also not associated with medical consultations that had occurred since week 50 or with abnormal LDH concentration at year 6 (Table 4).

Table 4. Log-binomial regressions for the association between medical and biochemical outcomes at year 6 with CHEU having a mtDNA depletion at week 50.

Clinical Consultation without Admission during the Last Year				
	<i>n</i>	Adjusted PR	95% CI	<i>p</i> Value
mtDNA depletion at week 50				
Yes	17	0.76	0.50–1.15	0.19
Hospital Admission Since the PROMISE-PEP Trial				
	<i>n</i>	Adjusted PR	95% CI	<i>p</i> Value
mtDNA depletion at week 50				
Yes	17	0.69	0.27–1.73	0.43
Abnormal LDH Concentration at Y6				
	<i>n</i>	Adjusted PR	95% CI	<i>p</i> Value
mtDNA depletion at week 50				
Yes	17	1.20	0.89–1.60	0.23

Abbreviations: PR, prevalence ratio; CI, confidence interval; mtDNA, mitochondrial DNA; LDH, lactate dehydrogenase; Y6, year 6.

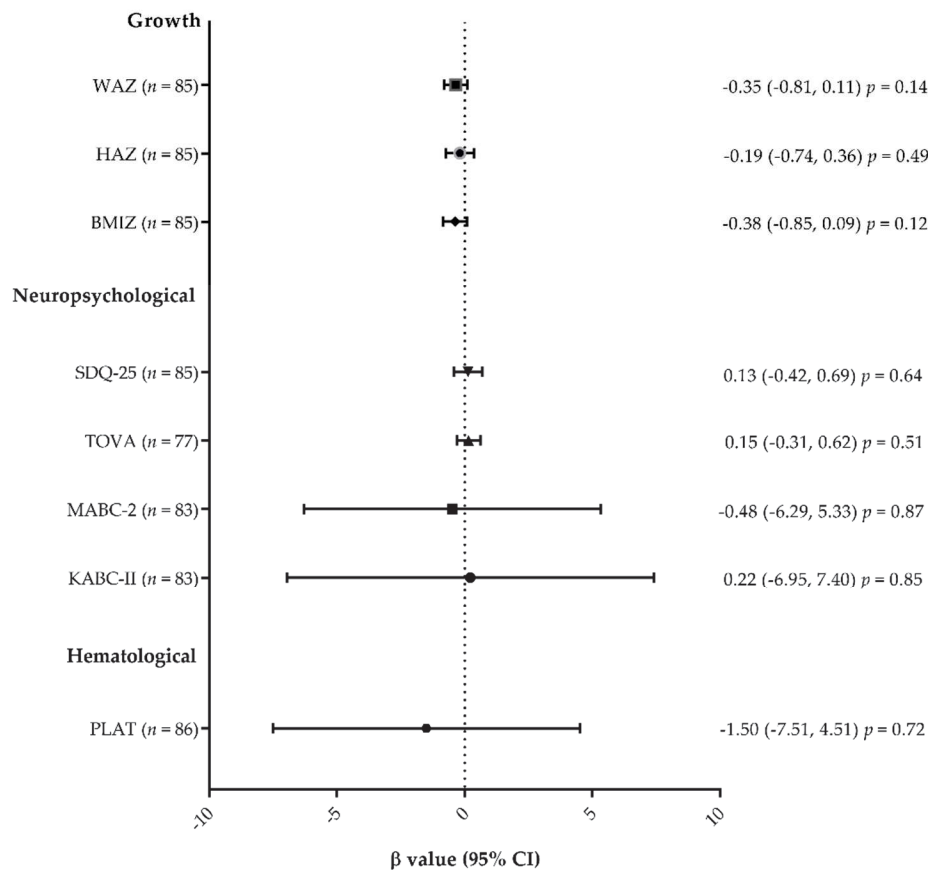


Figure 1. Forest plot of the association between anthropometric, hematological, and neuropsychological outcomes at year 6 with CHEU having a mtDNA depletion at week 50, using linear regressions. β values and confidence intervals are shown. Analyses were adjusted for gender and prophylactic treatment regimen. Abbreviations: WAZ, weight-for-age z-score; HAZ, height-for-age z-score; BMIZ, body mass index z-score; SDQ-25, Strengths and Difficulties Questionnaire; TOVA, Test of Variable of Attention; MABC-2, Movement Assessment Battery for Children—second edition; KABC-II, Kaufman Assessment Battery for Children—second edition; PLAT, platelet count; CI, confidence interval.

4. Discussion

Safety is the utmost priority for prevention interventions targeting a large number of persons. Supplementary ARV exposure early in life during prevention of MTCT HIV programs may increase the risk of mtDNA genotoxicity. Overall, the decrease of MCN previously observed during the first year of life among CHEU who received 3TC or LPV/r to prevent postnatal transmission of HIV through breastfeeding was not persistent five years after prophylaxis discontinuation. Furthermore, we demonstrated that mtDNA depletion at week 50 in children had no long-term impact on growth, clinical, and neuropsychological outcomes at year 6. Overall, these findings are very reassuring for different child populations: (i) most of the living CHEU (more than 15 million) who had been exposed in utero to 3TC, (ii) to the new CHEU who are an increasing population (about 1 million a year), and (iii) to HIV-infected children who initiated LPV/r- and/or 3TC-based treatment early in life.

We previously described mtDNA depletion at week 50 among CHEU receiving LPV/r or 3TC prophylaxis and identified male gender as a possible risk factor for being mtDNA depleted at one year of age [16]. The proportion of CHEU with mtDNA depletion was not different between the two random selections when restraining only to Burkina Faso and Uganda participants (28/91 (30.8% (95% CI: 22.2–40.9)) for the previous study versus 17/86 (19.8% (95% CI: 12.3–29.4)) for the current study; $p = 0.09$, chi-squared test). Although the prevalence was lower, confidence intervals overlapped. The proportion of CHEU with depletion in the LPV/r arm and in the 3TC arm also did not differ

between the two studies ($p = 0.10$ and $p = 0.46$, respectively, chi-squared test). Gender was equally distributed among CHEU with mtDNA depletion between the two studies (33 males versus 25 females for the previous study and 8 males versus 9 females for the current study; $p = 0.47$, chi-squared test).

Upon drug discontinuation, we observed an increasing trend in MCN in the whole population between one and 6 years of age. Increase of mtDNA content was previously observed in a U.S. cohort of CHEU exposed in utero to AZT or AZT/3TC [15]. Authors reported a rate of increase of 60 copies per cell per year. Herein, this rate was lower with an overall increase of 8.4 copies per cell per year (11.8 in the 3TC arm). However, in the U.S. study, ARV exposure was shorter since children were not breastfed and did not receive ARV prophylaxis.

The association of these health outcomes and a possible link to mitochondrial dysfunction is currently not established. A decrease of mtDNA content per cell leads to a low production of cell energy, which impacts organs requiring high energetic supply such as muscles, the heart, and the brain, and all of the others to a lower extent. In 2003, Barret et al. described neurologic symptoms including motor abnormalities and lower cognitive performance not only among CHEU with established mitochondrial dysfunction but also among those with a suspicion of mitochondrial impairment based on observation of persistent hyperlactatemia and impaired mitochondrial respiratory-chain enzymatic activity [27]. Another study, although not showing an association, identified CHEU with possible mitochondrial dysfunction based on neurologic manifestations including febrile or afebrile seizures and delay in cognitive development [28]. To our knowledge, only one study reported lower height-for-age Z-scores among HIV-infected children with lower mtDNA content and decreased complex IV enzymatic activity from the mitochondrial respiratory chain [29]. Children herein who accumulated ARV exposure during pregnancy and during the first year of life, had few health problems, growth impairment, or hematological abnormalities at six years of age. Furthermore, those who experienced mtDNA depletion at one year had the same growth, clinical, and neuropsychological outcomes at age 6 as the others. However, serum lactate concentration was abnormally elevated for two thirds of children, including 14/17 (82.3%) of those with mtDNA depletion. Hyperlactatemia is commonly used as a surrogate marker of mitochondrial dysfunction. Elevated serum lactate was observed in CHEU during the first year of life but association with MCN has not been reported [27,30–33]. In line with this, neither mtDNA depletion at week 50 nor MCN at year 6 were associated with hyperlactatemia in this study.

This study is unique because it describes (1) the longitudinal mtDNA content among CHEU older than all previous studies investigating MCN, which stop at school age, and (2) the evaluation of health outcomes at distance of PrEP regimen among African children, which represented 90% of the CHEU worldwide [1]. Furthermore, this study benefited from the randomization of the initial clinical trial. Several limitations to our study can be mentioned. First, CHEU from two sites of the initial trial could not be analyzed. In fact, a correlation between platelet count and MCN was previously observed during the first year of life for children from Zambia, which biased the analysis [16]. Follow-up of South African children was also not possible because samples at year 6 were not banked. Secondly, we did not have intermediate points between week 50 and year 6 that would have made the assessment more accurate. Thirdly, medical events, such as a history of clinical consultations or hospitalizations, were self-declared and not certified by a medical record. Finally, these children had a unique exposure to HIV and ARV, which makes the findings difficult to apply to other child populations. However, these findings can help to discriminate the true drug side effect from the HIV infection.

5. Conclusions

Altogether, adding ARV prophylaxis during the at-risk period of HIV transmission to CHEU, had no long-term health consequences for those who had mtDNA depletion at the end of ARV exposure. However, the current strategies for the prevention of MTCT use different drugs and treatment regimens, either for the mother or the child, suggesting that such mtDNA assessment and follow-up at distance of PrEP period is worth replicating.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/9/11/3680/s1>, Result details: Quality control of DNA, Table S1: Characteristics of CHEU from the PROMISE PEP trial enrolled in the analysis and CHEU not enrolled, Table S2: Overall dynamic of mtDNA content, Table S3: Characteristics at W50 of the CHEU with depletion between the PROMISE PEP and the PROMISE M&S trials.

Author Contributions: Conceptualization, N.N., T.T., P.V.d.P., and J.-P.M.; methodology, S.E.-D. and N.N.; validation S.E.-D. and J.-P.M.; formal analysis, A.M. and S.E.-D.; investigation, A.M., N.M., and J.K.T.; data curation, A.M. and S.E.-D.; writing—original draft preparation, A.M., N.N., and J.-P.M.; writing—review and editing, A.M., N.N., S.E.-D., N.M., J.K.T., T.T., P.V.d.P., and J.-P.M.; supervision, N.M. and J.K.T.; funding acquisition, N.N., P.V.d.P., T.T., and J.-P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The PROMISE-PEP study was supported by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS#12274), the European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (#CT.2006.33020.004), and the Research Council of Norway (GlobVac grant # 183600). The PROMISE M&S study was funded by the Pierre Bergé endowment fund in collaboration with SIDACTION, grant number AP-FPB-2013-2/09, and sponsored by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS#12174 and ANRS12341). A.M. is the beneficiary of a doctoral scholarship from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS12174-B90).

Acknowledgments: We would like to thank all the participating mothers, children, and caregivers, and all the members of the PROMISE Consortium.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funder had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- UNAIDS. Available online: <http://aidsinfo.unaids.org/> (accessed on 10 August 2020).
- UNAIDS. Progress towards the Start Free, Stay Free, AIDS Free Targets 2020 Report. Available online: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/start-free-stay-free-aids-free-2020-progress-report_en.pdf (accessed on 5 September 2020).
- Millar, J.R.; Bengu, N.; Fillis, R.; Sprenger, K.; Ntlantsana, V.; Vieira, V.A.; Khambati, N.; Archary, M.; Muenchhoff, M.; Groll, A.; et al. High-frequency failure of combination antiretroviral therapy in paediatric HIV infection is associated with unmet maternal needs causing maternal non-adherence. *EclinicalMedicine* **2020**, *22*, 100344. [[CrossRef](#)]
- World Health Organization. *Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach*, 2nd ed.; World Health Organization Press: Geneva, Switzerland, 2016; ISBN 978-92-4-154968-4.
- Ministry of Health. Zambia Consolidated Guidelines for Treatment and Prevention of HIV Infection. Available online: <https://www.moh.gov.zm/wp-content/uploads/filebase/Zambia-Consolidated-Guidelines-for-Treatment-and-Prevention-of-HIV-Infection-2020.pdf> (accessed on 24 September 2020).
- Desmonde, S.; Goetghebuer, T.; Thorne, C.; Leroy, V. Health and survival of HIV perinatally exposed but uninfected children born to HIV-infected mothers. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2016**, *11*, 465–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Onyango-Makumbi, C.; Owora, A.H.; Mwiru, R.S.; Mwatha, A.; Young, A.M.; Moodley, D.; Coovadia, H.M.; Stranix-Chibanda, L.; Manji, K.; Maldonado, Y.; et al. extended prophylaxis with nevirapine does not affect growth in hiv-exposed infants. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2019**, *82*, 377–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Blanche, S.; Tylleskär, T.; Peries, M.; Kankasa, C.; Engebretsen, I.; Meda, N.; Tumwine, J.K.; Singata-Madliki, M.; Mwiya, M.; Van de Perre, P.; et al. Growth in HIV-1-exposed but uninfected infants treated with lopinavir-ritonavir versus lamivudine: A secondary analysis of the ANRS 12174 trial. *Lancet HIV* **2019**, *6*, e307–e314. [[CrossRef](#)]
- Kariyawasam, D.; Peries, M.; Foissac, F.; Eymard-Duvernay, S.; Tylleskär, T.; Singata-Madliki, M.; Kankasa, C.; Meda, N.; Tumwine, J.K.; Mwiya, M.; et al. Lopinavir-Ritonavir Impairs Adrenal Function in Infants. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *71*, 1030–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boivin, M.J.; Maliwichi-Senganimalunje, L.; Ogwang, L.W.; Kawalazira, R.; Sikorskii, A.; Familiar-Lopez, I.; Kuteesa, A.; Nyakato, M.; Mutebe, A.; Namukooli, J.; et al. Neurodevelopmental effects of ante-partum and post-partum antiretroviral exposure in HIV-exposed and uninfected children versus HIV-unexposed and uninfected children in Uganda and Malawi: A prospective cohort study. *Lancet HIV* **2019**, *6*, e518–e530. [[CrossRef](#)]

11. Poirier, M.C.; Divi, R.L.; Al-Harathi, L.; Olivero, O.A.; Nguyen, V.; Walker, B.; Landay, A.L.; Walker, V.E.; Charurat, M.; Women and Infants Transmission Study (WITS) Group. Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2003**, *33*, 175–183. [[CrossRef](#)]
12. Divi, R.L.; Walker, V.E.; Wade, N.A.; Nagashima, K.; Seilkop, S.K.; Adams, M.E.; Nesel, C.J.; O'Neill, J.P.; Abrams, E.J.; Poirier, M.C. Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exposed in utero to Combivir. *AIDS* **2004**, *18*, 1013–1021. [[CrossRef](#)]
13. Divi, R.L.; Leonard, S.L.; Kuo, M.M.; Nagashima, K.; Thamire, C.; St. Claire, M.C.; Wade, N.A.; Walker, V.E.; Poirier, M.C. Transplacentally exposed human and monkey newborn infants show similar evidence of nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* **2007**, *48*, 201–209. [[CrossRef](#)]
14. Hernández, S.; Morén, C.; López, M.; Coll, O.; Cardellach, F.; Gratacós, E.; Miró, O.; Garrabou, G. Perinatal outcomes, mitochondrial toxicity and apoptosis in HIV-treated pregnant women and in-utero-exposed newborn. *AIDS* **2012**, *26*, 419–428. [[CrossRef](#)]
15. Aldrovandi, G.M.; Chu, C.; Shearer, W.T.; Li, D.; Walter, J.; Thompson, B.; McIntosh, K.; Foca, M.; Meyer, W.A.; Ha, B.F.; et al. Antiretroviral exposure and lymphocyte mtDNA content among uninfected infants of HIV-1-infected women. *Pediatrics* **2009**, *124*, e1189–e1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Monnin, A.; Nagot, N.; Peries, M.; Vallo, R.; Meda, N.; Singata-Madliki, M.; Tumwine, J.K.; Kankasa, C.; Ngandu, N.; Goga, A.; et al. Mitochondrial DNA parameters in blood of infants receiving lopinavir/ritonavir or lamivudine prophylaxis to prevent breastfeeding transmission of HIV-1. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Liu, Y.; Park, E.S.; Gibbons, A.T.; Shide, E.D.; Divi, R.L.; Woodward, R.A.; Poirier, M.C. Mitochondrial compromise in 3-year old patas monkeys exposed in utero to human-equivalent antiretroviral therapies. *Environ. Mol. Mutagen.* **2016**, *57*, 526–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. McHenry, M.S.; McAteer, C.I.; Oyungu, E.; McDonald, B.C.; Bosma, C.B.; Mpofo, P.B.; Deathe, A.R.; Vreeman, R.C. Neurodevelopment in Young Children Born to HIV-Infected Mothers: A Meta-analysis. *Pediatrics* **2018**, *141*, e20172888. [[CrossRef](#)]
19. Wedderburn, C.J.; Evans, C.; Yeung, S.; Gibb, D.M.; Donald, K.A.; Prendergast, A.J. Growth and Neurodevelopment of HIV-Exposed Uninfected Children: A Conceptual Framework. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **2019**, *16*, 501–513. [[CrossRef](#)]
20. United States National Library of Medicine. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03519503?term=promise+m%26s&draw=2&rank=1> (accessed on 1 October 2020).
21. Nagot, N.; Kankasa, C.; Meda, N.; Hofmeyr, J.; Nikodem, C.; Tumwine, J.K.; Karamagi, C.; Sommerfelt, H.; Neveu, D.; PROMISE-PEP group; et al. Lopinavir/Ritonavir versus Lamivudine peri-exposure prophylaxis to prevent HIV-1 transmission by breastfeeding: The PROMISE-PEP trial Protocol ANRS 12174. *BMC Infect. Dis.* **2012**, *12*, 246. [[CrossRef](#)]
22. Nagot, N.; Kankasa, C.; Tumwine, J.K.; Meda, N.; Hofmeyr, G.J.; Vallo, R.; Mwiya, M.; Kwagala, M.; Traore, H.; Sunday, A.; et al. Extended pre-exposure prophylaxis with lopinavir-ritonavir versus lamivudine to prevent HIV-1 transmission through breastfeeding up to 50 weeks in infants in Africa (ANRS 12174): A randomized controlled trial. *Lancet* **2016**, *387*, 566–573. [[CrossRef](#)]
23. World Health Organization. *Antiretroviral Drugs for Treating Pregnant Women and Preventing HIV Infection in Infant: Towards Universal Access: Recommendations for a Public Health Approach*; World Health Organization Press: Geneva, Switzerland, 2006; ISBN 978-92-4-159466-0.
24. Timmermans, E.C.; Tebas, P.; Ruiters, J.P.N.; Wanders, R.J.A.; de Ronde, A.; de Baar, M.P. Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay to quantify changes in mitochondrial DNA concentrations in cell cultures and blood cells from HIV-infected patients receiving antiviral therapy. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 979–998. [[CrossRef](#)]
25. Ashar, F.N.; Moes, A.; Moore, A.Z.; Grove, M.L.; Chaves, P.H.M.; Coresh, J.; Newman, A.B.; Matteini, A.M.; Bandeen-Roche, K.; Boerwinkle, E.; et al. Association of mitochondrial DNA levels with frailty and all-cause mortality. *J. Mol. Med.* **2015**, *93*, 177–186. [[CrossRef](#)]
26. Hurtado-Roca, Y.; Ledesma, M.; Gonzalez-Lazaro, M.; Moreno-Loshuertos, R.; Fernandez-Silva, P.; Enriquez, J.A.; Laclaustra, M. Adjusting MtDNA quantification in whole blood for peripheral blood platelet and leukocyte counts. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163770. [[CrossRef](#)]

27. Barret, B.; Tardieu, M.; Rustin, P.; Lacroix, C.; Chabrol, B.; Desguerre, I.; Dolfus, C.; Mayaux, M.-J.; Blanche, S.; French Perinatal Cohort Study. Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-1-exposed but uninfected infants: Clinical screening in a large prospective cohort. *AIDS* **2003**, *17*, 1769–1785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Brogly, S.B.; Ylitalo, N.; Mofenson, L.M.; Oleske, J.; Van Dyke, R.; Crain, M.J.; Abzug, M.J.; Brady, M.; Jean-Philippe, P.; Hughes, M.D.; et al. In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and signs of possible mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected children. *AIDS* **2007**, *21*, 929–938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Shen, J.; Liberty, A.; Shiao, S.; Strehlau, R.; Pierson, S.; Patel, F.; Wang, L.; Burke, M.; Violary, A.; Coovadia, A.; et al. Mitochondrial Impairment in Well-Suppressed Children with Perinatal HIV-Infection on Antiretroviral Therapy. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2020**, *36*, 27–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Alimenti, A.; Burdge, D.R.; Ogilvie, G.S.; Money, D.M.; Forbes, J.C. Lactic acidemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants exposed to perinatal antiretroviral therapy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2003**, *22*, 782–789. [[CrossRef](#)]
31. Noguera, A.; Fortuny, C.; Muñoz-Almagro, C.; Sanchez, E.; Vilaseca, M.A.; Artuch, R.; Pou, J.; Jimenez, R. Hyperlactatemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants who are exposed to antiretrovirals. *Pediatrics* **2004**, *114*, e598–e603. [[CrossRef](#)]
32. Ekouevi, D.K.; Touré, R.; Becquet, R.; Viho, I.; Sakarovitch, C.; Rouet, F.; Towne-Gold, B.; Fassinou, P.; Leroy, V.; Blance, S.; et al. Serum lactate levels in infants exposed peripartum to antiretroviral agents to prevent mother-to-child transmission of HIV: Agence Nationale de Recherches Sur le SIDA et les Hépatites Virales 1209 study, Abidjan, Ivory Coast. *Pediatrics* **2006**, *118*, e1071–e1077. [[CrossRef](#)]
33. Fernández Ibieta, M.; Cano, J.M.B.; Amador, J.T.R.; González-Tomé, M.I.; Martín, S.G.; Gómez, M.N.; de José, M.I.; Beceiro, J.; Iglesias, E.; Prieto, L.; et al. In-utero antiretroviral exposure and mitochondrial toxicity in a cohort of uninfected infants born to HIV-1-infected women. *An. Pediatr.* **2010**, *73*, 180–188. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article 3

« Longitudinal follow-up of blood telomere length in children who are HIV-exposed uninfected receiving one-year of lopinavir/ritonavir or lamivudine drug as prophylaxis »

Cette troisième partie traite de la toxicité génomique des ARV, et plus particulièrement de leurs impacts sur la longueur des télomères. Nous abordons la génotoxicité aiguë et sur le long terme des deux prophylaxies antirétrovirales, 3TC et LPV/r, puis la relation entre la toxicité aiguë et la croissance et le développement neurocognitif des enfants à 6 ans.

Les méthodes quantifiant la longueur des télomères sont nombreuses mais seules quelques-unes restent d'intérêt en épidémiologie ou pour l'étude des populations. On distingue notamment la technique TRF (de l'anglais *telomere restriction fragment*) associée au Southern Blot, le FISH (de l'anglais *fluorescent in situ hybridization*) couplé à la cytométrie en flux ou bien encore la PCR quantitative. Cette dernière reste néanmoins la plus appropriée pour les études incluant de larges cohortes d'individus en raison de son faible coût, de sa facilité de mise en œuvre mais également par la faible quantité d'ADN requise.

La revue de la littérature met en avant la prédominance de la quantification relative de la longueur des télomères par PCR quantitative, d'après la méthode initialement développée par le groupe de Cawthon en 2002 (PCR multiplexe) et sa révision en 2009 (PCR monoplexe monochrome)^{520,521}. Celle-ci estime un ratio télomère/gène nucléaire en copie unique (ratio T/S) normalisé à partir de l'amplification d'un gène de référence, ADN génomique commercial ou pool d'ADN fabriqué au sein du laboratoire. La comparaison des ratios T/S entre les laboratoires est cependant rendue difficile par les multiples adaptations de cette méthode utilisées, notamment dans le choix du gène standard de référence⁵²². Pour s'affranchir de ce problème, O'Callaghan et Fenech ont développé en 2011 une méthode de quantification absolue exprimant la longueur des télomères par génome, méthode pour laquelle nous avons opté⁵²³. Celle-ci dérive de la méthode de Cawthon à la différence qu'elle utilise des concentrations connues d'oligomères synthétiques contenant soit des répétitions TTAGGG soit un gène nucléaire en copie unique. Chaque oligomère sert ainsi de standard de référence pour la réaction à laquelle il est associé. Cette méthode a d'ailleurs été utilisée au cours de l'une des rares études menées chez les CHEU⁴⁹⁹.

Comme nous l'avons précédemment mentionné dans l'état de l'art, les PLWH présentent un vieillissement prématuré et développent plus précocement des pathologies liées à l'âge,

pathologies habituellement observées lors du vieillissement physiologique des individus dans la population générale. Ces observations couplées à notre objectif d'identifier au plus tôt les CHEU dont la santé pourrait être affectée sur le long terme nous ont orienté vers une étude ciblant ceux qui présentaient une diminution de la longueur des télomères dans le sang total entre D7 et W50. Enfin, de façon similaire à l'étude de toxicité mitochondriale sur le long terme, nous avons analysé les associations entre cette diminution de la longueur des télomères au cours de la première année de vie et la croissance et le développement neuro-psychomoteur des enfants à 6 ans.

Ce travail est présenté dans l'article 3 qui suit (en soumission dans *Frontiers in Medicine*) ; les Supplementary Materials sont disponibles en Annexes.

Longitudinal follow-up of blood telomere length in children who are HIV-exposed uninfected having received one-year of lopinavir/ritonavir or lamivudine as prophylaxis

Audrey Monnin^{1*}, Amélie Vizeneuve¹, Nicolas Nagot², Sabrina Eymard-Duvernay¹, Nicolas Meda³, Mandisa Singata-Madliki⁴, Grace Ndeezi⁵, James K Tumwine⁵, Chipepo Kankasa⁶, Ameena Goga⁷, Thorkild Tylleskär⁸, Philippe Van de Perre² and Jean-Pierre Molès¹

¹Pathogenèse et Contrôle des Infections Chroniques, INSERM U1058, Université Montpellier, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France

²Pathogenèse et Contrôle des Infections Chroniques, INSERM U1058, Université Montpellier, Centre Hospitalier Universitaire, Montpellier, France

³Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

⁴Effective Care Research Unit, Cecilia Makiwane Hospital, University of Fort Hare, East London, South Africa

⁵Department of Paediatrics and Child Health, School of Medicine, College of Health Sciences, Makerere University, Kampala, Uganda

⁶Department of Paediatric and Child Health, University Teaching Hospital, University of Zambia School of Medicine, Lusaka, Zambia

⁷Department of Paediatrics and Child Health, University of Pretoria, South Africa

⁸Centre for International Health, Faculty of Medicine, University of Bergen, 5009 Bergen, Norway

*** Correspondence:**

Audrey Monnin

audrey.monnin@inserm.fr

Keywords: HIV, children, prophylaxis, telomere shortening, growth, neuropsychological development, mitochondrial DNA, Africa.

Abstract

Telomere shortening can be enhanced by Human Immunodeficiency Virus (HIV) and by antiretroviral (ARV) exposures. The aim of this study was to evaluate the acute and long-term effect of two ARV prophylaxis, lopinavir/ritonavir (LPV/r) and lamivudine (3TC), administered to children who are HIV-exposed uninfected (CHEU) to prevent HIV acquisition through breastfeeding during the first year of life on telomere shortening, and to investigate the relationship between telomere shortening and health outcomes at six years of age. We included 198 CHEU and measured telomere length at seven days of life, at week-50 and at six years (year-6) using quantitative polymerase chain reaction. At week-50, telomere shortening was observed among 44.3% of CHEU but was neither associated with poor growth indicators nor neuropsychological outcomes at year-6, except for motor abilities (MABC test $n=127$, $\beta=-3.61$, 95%CI: -7.08,-0.14; $p=0.04$). Safety data on telomere shortening for infant prophylaxis are scarce but deserve attention if considering telomere shortening as a biomarker of child health impairment.

Introduction

Assaying the short- and long-term safety of ARV therapy is of utmost priority for public health guidelines on ARV regimens for HIV prevention and treatment. Given the urgent needs to prevent or treat HIV, most ARV regimens have been established by a panel of experts using evidence from randomized, phase 3 clinical trials that have directly compared ARV regimens in research settings. Data on short-term safety of ARV for pediatric use come from phase 1/2 safety and pharmacokinetic trials and nonrandomized, open-label studies. Nonetheless, pediatric ARV treatment regimens have proven effective in controlling HIV viral load and improving health outcomes in HIV-infected children but excess morbidities and mortalities are still reported in these paediatric populations (1–3). The long-term side effects of ARV are poorly documented mainly because of the difficulty to truly discriminate drug effects from those of HIV exposure and/or infection.

Telomeres are the caretakers of our genetic information. These highly conserved DNA repeated sequences that cap the ends of the chromosomes prevent their degradation and their fusion, thus ensuring genomic stability (4). Telomere shortening is a physiological event that occurs at each cell division in all somatic cells and is associated with age-related disorders (5). Many factors are associated with an accelerated telomere shortening, such as male gender, smoking, alcohol consumption, ethnicity, obesity, sedentary lifestyle, genetic variants, socioeconomic status as well as psychological stress (5,6). Both ARV and HIV are known to promote telomere shortening. Chronic HIV-induced inflammation and free HIV viral particles themselves can enhance the production of reactive oxygen species damaging telomeric DNA and thus promoting telomere shortening (7–9). Protease inhibitors (PI) (10–14), and particularly lopinavir (10), as well as nucleoside reverse transcriptase inhibitors induce reactive oxygen species production in several cell types or animal models (15–18). A recent study reported an inverse relationship between leucocyte telomere shortening and blood mitochondrial DNA content among HIV-infected or uninfected women: those who had the fastest telomere shortening over time were also more likely to simultaneously have an increase in their mitochondrial DNA content, and inversely (19).

If telomere shortening-associated premature aging was observed in adults living with HIV (20–24), relatively fewer studies investigated telomere length in younger populations. Of note, all but one study were conducted outside Africa, the continent with the highest prevalence of HIV-infected children and children who are HIV-exposed uninfected (CHEU) (25). One study reported shorter telomere length in HIV-infected children compared to children who are HIV-unexposed uninfected (CHUU) in early life

(26), while another did not show difference between HIV-infected and uninfected adolescents (27). This discrepancy could possibly be explained by the age differences between cohorts and by the duration of ARV exposure. The impact of ARV exposure on telomere length was also addressed in CHEU in cross-sectional studies at different time points. Most of them described similar telomere length at birth between CHUU and CHEU who have been exposed *in utero* to zidovudine (AZT) (28), to the backbone AZT plus lamivudine (3TC) in combination with nevirapine (NVP), nelfinavir (NFV) or ritonavir-boosted protease inhibitor (PI) (29,30) or to other triple combination including abacavir (ABC), tenofovir disoproxil fumarate (TDF) or emtricitabine (FTC) (29,30). Later in childhood, CHEU exposed *in utero* to AZT/3TC/NVP (26), AZT/3TC/PI (26,27), or TDF/FTC/PI (26) also presented similar telomere length at approximately two years of age compared to CHUU. However, one study reported shorter telomere length in CHEU aged 6 years exposed *in utero* to 3TC plus lopinavir/ritonavir (LPV/r)-based regimens including ABC, AZT or stavudine, compared to CHUU (31). Only one longitudinal study showed telomere length shortening from birth to 3 years old among CHEU and CHUU (30). Some of these children also received a short term (6 weeks) postnatal prophylaxis including AZT (26–28,30), AZT/3TC or AZT or ABC/FTC/NFV (27). More recently, ritonavir-boosted protease inhibitors was a risk factor for telomere shortening in HIV-infected pregnant women (32).

In a randomized controlled trial (PROMISE-PEP trial, NCT00640263), we tested the efficacy of infant single drug pre-exposure prophylaxis to prevent mother-to-children transmission of HIV in breastfed CHEU (33,34). These children received an ARV prophylaxis of LPV/r or 3TC up to one year of age, providing a unique population to evaluate the impact of these drugs on telomere length among uninfected children, and without interference with other drugs from combined therapy. Furthermore, we conducted a follow-up study of these trial participants at the age of 6 years to evaluate growth, clinical and neurodevelopment outcomes post-ARV exposure (PROMISE-M&S trial, NCT03519503).

The objectives of the present study were to evaluate the short- and long-term effect of two ARV treatment, LPV/r and 3TC, administered to prevent HIV acquisition during the first year of life of CHEU on telomere length, and whether telomere shortening was associated with growth, clinical and neurodevelopmental outcomes as well as with mitochondrial DNA content.

Patients and Methods

Study population

We performed a longitudinal observational study of CHEU enrolled in the PROMISE PEP trial (NCT00640263) and in the follow-up study (PROMISE M&S, NCT03519503). In the PROMISE PEP trial, conducted in Burkina Faso, South Africa, Uganda and Zambia between November 2009 and May 2012, CHEU received daily LPV/r or 3TC prophylaxis to prevent mother-to-child-transmission of HIV-1 through breastfeeding (33,34). Briefly, these uninfected children at birth received seven days of NVP as per national guidelines and were thereafter randomly assign to receive LPV/r or 3TC from seven days after birth (day-7) until one week after breastfeeding discontinuation, for a maximal duration of fifty weeks (W50). We referred to this group as the pre-exposure prophylaxis (PrEP) group hereafter. The PROMISE M&S study (recruitment from February 2017 to February 2018) consisted of a one- or two-day visit for a growth, clinical and neuropsychological evaluation of the PROMISE PEP trial participants aged 5 to 7 years who were HIV-negative at the end of the prophylaxis period (34). Among PROMISE M&S participants, we randomly selected 198 CHEU with a 1:1 sex and prophylactic regimen ratios. The same selection criteria were used in a previous study investigating the mitochondrial DNA genotoxicity of the prophylaxis (35). We also included 40 South African CHEU

from the South African prevention of mother-to-child transmission Evaluation survey, recruited between September 2012 to March 2013 (36). These South African children and their mothers did not receive any ARV prophylaxis or ARV therapy respectively. Details have been published elsewhere (35).

Sample collection and DNA extraction

Child dried blood spots (Whatman®903 cards) were collected on study sites directly by heel prick for day-7 (PROMISE PEP trial), week-6 and week-50 time points (PROMISE PEP trial and South African prevention of mother-to-child transmission Evaluation survey) or were processed from venous blood collected on EDTA tubes for the year-6 time point (PROMISE M&S trial). All dried blood spots were stored at -20°C at the study sites in an individual zipped-pouch containing desiccant. DNA extraction was performed on 3-mm diameter punches (n=3) using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Extracted DNAs were stored at -80°C.

Telomere length assay

2.3.1 Standard curves and quantitative polymerase chain reaction

Telomere length measurement was performed by quantitative polymerase chain reaction, based on a method previously described by O'Callaghan and Fenech (37). Two standard curves were used. The first one was generated by a ten-fold serial dilution of a synthetic oligonucleotide of 14 repetitions of the telomeric sequence (TAAGGG) which determines a quantity of telomere in kilobases (kb) per reaction. The standard concentration ranged from 1.18×10^3 to 1.18×10^7 kb of telomere per reaction. The second one consisted of a ten-fold serial dilution of a synthetic oligomer of the human single copy gene *RPLP0* which estimated the copy number of diploid genomes per reaction. The concentration ranged from 2.63×10^1 to 2.63×10^5 of diploid genome copies. Oligomers and primers used for the quantitative polymerase chain reactions are described in the Supplementary material (Supplementary Table S1).

Each quantitative polymerase chain reaction plate contained (i) both standard curves in duplicate, (ii) DNA (10 ng) from the Human Embryonic Kidney 293T cell line in triplicate to assess the intra- and inter-plate variations (38), and (iii) DNA (10 ng) extracted at day-7, week-50 and year-6 for each participants, in a single point assay for telomeric and *RPLP0* regions. Amplification was performed on a LightCycler®480 II instrument (Roche, Bâle, Switzerland) in a final volume of 30µL containing 1X LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche, Bâle, Switzerland) and 900 nM of both pairs of primers. The following thermal program was used: 95°C for 10 minutes; 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and ended by a melting curve.

2.3.2 Telomere data analysis

We performed absolute quantification analysis using the Fit Points method on a LightCycler®480 software (Roche, Bâle, Switzerland). The threshold line was set at the beginning of the exponential phase of amplification. Telomere length per cell was calculated by dividing the Kb/reaction for telomere by the *RPLP0* diploid copies/reaction. Results were expressed in Kb telomere per cell.

qPCR efficiency, intra- and interplate coefficients of variation, quality control of quantitative polymerase chain reactions and outliers identification are described in the Supplementary material.

Statistical analysis

We described the participant characteristics using means with standard deviation (SD) or medians with interquartile range ([IQR]) for continuous variables, and percentages for categorical variables.

Our first objective was to investigate the short term and long-term effect of ARV prophylaxis on telomere length. We first described the telomere length at day-7, i.e. before the initiation of the prophylactic regimens, and compared this parameter according to study sites and gender using Kruskal-Wallis test applying the Dwass-Steel-Critchlow-Fligner method for all pairwise comparisons, and Wilcoxon Mann-Whitney test respectively.

Secondly, we addressed the variation of the telomere length between t_0 (day-7 or week-6 or week-50) and t_1 (week-6 or week-50 or year-6). We compared telomere length between the two time points using Wilcoxon signed-rank test, and defined telomere shortening as follows:

$$\text{Telomere shortening} = [(TL \text{ at } t_1) + 4.03\% * (TL \text{ at } t_1)] - [(TL \text{ at } t_0) - 4.03\% * (TL \text{ at } t_0)] < 0$$

where 4.03% was the estimated experimental error (see Supplementary materials).

We compared the proportion of CHEU with telomere shortening at week-50 (t_0 =day-7) or at year-6 (t_0 =week-50) between the two prophylactic regimens using Chi-square test. Analyses for telomere shortening between week-50 and year-6 were restricted to three out the four study sites ($n=128$), i.e. Burkina Faso, Uganda and Zambia, because samples for South Africa were not collected at year-6. In a sub-analysis with South African CHEU, we compared the proportion of children with telomere shortening at W50 (t_0 =week-6) between children who had not receive an ARV prophylaxis and those who had received the two prophylaxis regimens.

Throughout the analyses, we compared the two prophylactic regimens, i.e LPV/r and 3TC, using Student's t-test or Wilcoxon Mann-Whitney test for continuous variables and using Chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables.

Our secondary objective was to address whether telomere shortening at week-50 was associated with child health impairments at year-6 and with higher mitochondrial DNA content. For this purpose, we first investigated the association between growth indicators (weight-for-age Z-score, height-for-age Z-score and body mass index Z-score) and neuropsychological performances (global scores obtained from the Strengths and Difficulties Questionnaire, SDQ-25; the Test Of Variable of Attention, TOVA; the Movement Assessment Battery for Children second edition, MABC-2 and the Kaufman Assessment Battery for Children second edition, KABC-II) at year-6 with telomere shortening at week-50 using linear regressions. Methodology for scores analysis and main findings are described elsewhere (39). Score for SDQ-25 was squared transformed to obtain a normal distribution. We also investigated the association between hospital admissions since week-50 and telomere shortening at week-50 using Poisson regressions with robust error variance. Growth analyses were adjusted for the prophylaxis, the age of the child, the gender, the gestational age, the study site, the type of income generating activities, the education of the mother and the number of children under five years old living in the household. Neuropsychological and hospital admissions analyses were adjusted for the same cofounders plus the child weight and height at year-6. All of these analyses were restricted to Burkina Faso, Uganda and Zambia for the reason mentioned above.

Secondly, we investigated the association between telomere length and shortening with mitochondrial DNA content using linear regressions in an analysis restricted to CHEU from Burkina Faso and Uganda ($n=73$). Zambia was excluded from the analyses because we previously reported an interaction between mitochondrial DNA content and platelet count (40). Mitochondrial DNA depletion was defined as a

50% or more decrease in mitochondrial DNA copy number per cell from day-7 to week-50 (35). Mitochondrial DNA content at day-7, week-50 and year-6 were incremented per 50 copies. Analyses at week-50 and year-6 were adjusted for the type of prophylactic regimen. To address whether telomere shortening at week-50 was associated with mitochondrial DNA depletion at week-50, we used log-binomial regressions adjusted for the type of prophylactic regimen.

Statistical analyses were performed using SAS studio (Copyright © 2012-2016, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Forest plot was drawn using GraphPad software 7.0 (Copyright © 1992-2018).

Ethical consideration

Written informed consents were obtained from the mother or the legal representative prior to enrolment in the ANRS 12174 PROMISE-PEP trial (NCT00640263) and the PROMISE M&S trial (NCT03519503) and the mother/primary caregiver in the South African prevention of mother-to-child transmission Evaluation survey. The consent included the use of the banked samples for ancillary studies related to HIV infection which were approved by the scientific advisory board. The main protocol was approved by the Biomedical Research Ethics Committee in Zambia (N° 008-02-080 & 002-12-15), the Uganda National Council for Science and Technology (N° HS 470 & HS1988), the Stellenbosh University ethics committees for South Africa (N° M09/11/043) and the Ethical Committee for Health Research in Burkina Faso (N° 2008-039 & 2016-4-041).

1 Results

Characteristics of the study population

One hundred and sixty-seven CHEU were enrolled in our study after quality control of DNA (Supplementary Figure S1). The characteristics of CHEU analysed did not differ from those who were not selected except they had lower platelet count (Supplementary Table S2). Children were equally distributed between the four sites of the trial (Table 1). Most of them were born at term. At day-7, means for weight and height were 3.3 ± 0.5 and 49.6 ± 2.0 , respectively. However, 10.6% to 15.4% of CHEU had either stunted growth or were wasted or underweight. Haemoglobin concentration and blood cells concentrations were within normal range for more than 92.0% CHEU. Although no difference between prophylactic groups was observed, the prevalence of CHEU with stunting or wasting was around two fold higher for those who received LPV/r as compared to those who received 3TC. Characteristics of CHEU according to study sites were described in Supplementary Tables S3 to S6.

According to the national prevention of mother-to-child transmission guidelines prevailing at the time the trial was conducted (2009-2012), none of the mothers received an ARV treatment before the first antenatal visit. As per inclusion criteria, CD4 cell count was above 350 cells/mm³ (Table 2) and no mother was on ARV therapy. ZDV prophylaxis was the main ARV regimen given during pregnancy, followed by the combination ZDV plus 3TC. Viral load was controlled (less than 1000 copies/mL) in 59.3% of the mothers at day-7. Approximately 80.0% of mothers had an income generating activity and 85.0% had ever attended school. Almost all mothers did not smoke during pregnancy or during the breastfeeding period. However, more than one third reported alcohol consumption during pregnancy. No maternal differences between prophylactic groups was observed at randomisation. However, mothers who had ever attended school seemed to be lower in the 3TC group as compared to those in the LPV/r group, and inversely for those who had regular income generating activity. Characteristics of the mothers according to study sites are described in Supplementary Tables S7 to S10.

Telomere length at day-7

At randomization (day-7), median telomere length was 294 kb/cell with an interquartile range of 144 and 438 (Table 3). Telomere length was significantly different between sites ($p<0.01$), CHEU from South Africa having the lowest telomere length compared to CHEU from the three other sites which were similar ($p<0.01$ for South Africa versus Burkina Faso, South Africa versus Uganda and South Africa versus Zambia; $p=0.51$ for Burkina Faso versus Uganda; $p=1.00$ for Burkina Faso versus Zambia; $p=0.58$ for Uganda versus Zambia). Medians of telomere length (kb/cell) for the 3TC and for the LPV/r groups were 270 [137;434] and 321 [152;445], respectively ($p=0.29$). No difference according to gender was observed (Supplementary Table S11).

Telomere length after one year of prophylaxis

Overall after one year of prophylaxis, telomere length remained stable as compared to baseline (day-7) value with a median of 294 kb/cell [141;417] ($p=0.62$) (Table 4). However, when dichotomizing telomere length by profile, 74 CHEU (44.3%) had telomere shortening at week-50, 34 (45.3%) in the LPV/r group and 40 (43.5%) in the 3TC group ($p=0.81$).

Sub-analysis of telomere length including CHEU from South Africa not having received ARV prophylaxis

Characteristics of mothers and children are described in Supplementary Table S12. No difference between the South African control group and the South African PrEP group was observed except for the province of residency and the breastfeeding pattern. In South African CHEU, telomere shortening between week-6 and week-50 was more frequent in the control group than in the PrEP group ($p=0.04$), affecting 12 (32.4%) and 4 (12.1%) CHEU respectively (Table 5).

Telomere length at six years old

Characteristics of CHEU with available samples at year-6 ($n=128$ CHEU from Burkina Faso, Uganda and Zambia) are described in Supplementary Table S12. No difference between prophylactic groups was observed. Among these children, telomere length decreased from week-50 with a median of 333 kb/cell [252;444] to reach a median of 274 kb/cell [182;368] at year-6 ($p=0.58$). Eighty-six CHEU (67.2%) had telomere shortening at year-6, 43 in each prophylactic group ($p=0.61$). Among these children, 25 (29.1%) already had telomere shortening during the first year of life.

Health outcomes at six years old among CHEU with telomere shortening at week-50

Characteristics at week-50 of CHEU with or without telomere shortening are described in Supplementary Table S13. No difference between the two populations was observed except for the gestational age ($p<0.01$). Furthermore, the prevalence of prematurity seemed to be two fold higher among CHEU without telomere shortening ($p=0.20$) as compared to those with telomere shortening.

Linear and Poisson regression with robust error variance after adjustment for confounders showed that telomere shortening at week-50 was neither associated with poor growth indicators at year-6 (Figure 1), nor hospital admissions since week-50 ($PR= 0.75$, 95%CI: 0.42,1.35; $p=0.34$). However, among neuropsychological performances, motor capacities assessed by the MABC-2 test seemed to be negatively affected by telomere shortening at week-50 ($\beta= -3.61$, 95%CI: -7.08,-0.14); $p=0.04$) (Figure 1).

Relationship between telomere length and shortening with mitochondrial DNA content

We investigated the relationship between telomere length and mitochondrial DNA content in an analysis restricted to CHEU from Burkina Faso and Uganda (n=73). At day-7, linear regressions showed that telomere length was not associated with mitochondrial DNA content (n=73, $\beta_1=1.52$, 95%CI: -9.28,12.33; p=0.78). After adjustment for the prophylactic regimen, we observed at week-50 that the more the mitochondrial DNA content is low, the higher the telomere length is (n=73, $\beta_1=-7.2$, 95%CI: -13.8,-0.72; p=0.03), but at year-6 there was no association (n=73, $\beta_1=2.95$, 95%CI: -8.89,14.78; p=0.63). Finally, telomere shortening at week-50 was not associated with mitochondrial DNA depletion at week-50 after adjustment for the prophylactic regimen (n=73, PR=1.37, 95%CI: 0.86,2.19; p=0.19).

Discussion

In this study, CHEU receiving 3TC or LPV/r prophylaxis during breastfeeding exhibited similar telomere dynamic at one year of age. The prevalence of CHEU with telomere shortening at week-50 was similar between the two prophylactic regimens. The sub-analysis with children from South Africa suggests that exposure to the sole HIV could be more deleterious than exposure to both HIV and ARV. Telomere length did not significantly decreased thereafter until six years old. Finally, those identified with telomere shortening had not impaired growth or poorer clinical outcomes at year-6 but motor impairment.

In contrast to others studies carried out among CHEU or HIV-infected children, which have assessed telomere length from whole venous blood, we measured telomere length from dried blood spots. Scarce studies supports dried blood spots as a less invasive method for measuring this parameter but they reported a high correlation between relative telomere length in dried bloods spots and whole venous blood (41,42).

Overall, studies investigating telomere length among CHEU are scarce. This is particularly true for longitudinal evaluation of telomere length. So far, reports on safety of infant ARV prophylaxis on telomere length was poorly investigated in the literature. Reassuring data for using short course, i.e six weeks, infant ZDV prophylaxis on telomere length was previously reported. Gianesin et al. showed similar telomere length between CHEU receiving prophylaxis compared to CHUU (26). Furthermore, one longitudinal study did not show variation in telomere length from birth to 31 days among 58 Canadian CHEU receiving ZDV (30). However, in contrast to ours, this latter study also reported rapid telomere length decrease during the first 40 weeks of life among 214 CHEU (30). It is noteworthy that one third of the mothers from this study smoked during pregnancy, which is a well-known risk factor for faster telomere length attrition (43), while smoking during pregnancy was almost never reported among the PROMISE PEP participants. In addition, the type and the duration of ARV given during pregnancy were different from our study. Mothers received triple ARV therapy for 20 weeks in average and children received a shorter 6 weeks of ZDV prophylaxis at birth, while mothers from the present study mostly received ZDV or dual ZDV plus 3TC for 9 weeks and children the mono-prophylaxis for one year. Together, these observations highlight the high heterogeneity between studies. In addition, there is an absence of a consensus for a reference value for telomere length among different populations and throughout. Similarly, a consensus for the definition of telomere shortening is missing. Hence, making comparisons between studies turned out to be difficult.

Our work is unique as it described telomere length evolution among an African cohort of CHEU. To date, only one study investigated telomere length among South African CHEU but in a cross-sectional

design (31). In addition, we followed-up CHEU at later age than a previous published longitudinal study describing telomere length until three years of age (30), and conducted original investigations on the relationship between telomere shortening and growth and neuropsychological development at school age. Furthermore, given that a small proportion of mothers has smoked during pregnancy and breastfeeding, our analysis obviates the major confounding factor which was commonly encountered in the other studies among CHEU. Also, we benefited from the randomization of the PROMISE PEP trial thus minimizing the risk of selection bias, participants bias and confounding factors bias. Telomere length measurement was well-performed according to robust, standardized method with similar or lower inter- and intra-assay coefficients of variation as compared with the other studies reported so far among CHEU (26,27,29,30). However, our study also presents limitations. First, we have not been able to observe an effect of the gender on telomere length. Yet, “being a male” is a well-known factor associated with shorter telomere length in comparison to female in the general population (44–46). However, it is not clear whether this gender effect is already present at birth. Some studies reported this observation in newborns (46,47) while others did not find such difference between male and female babies (48,49). Among CHEU, one study reported an association between male gender and shorter telomere length at birth (30), which could not be related to a sample size effect (n=106 versus n=167). However, one could speculate that this gender effect could be related to the ethnic disparity between the two studies, the first one encompassing CHEU from different origins (Indigenous, Black/African Canadian, White and Asian) while we enrolled only African CHEU. Ethnicity is a known factor associated with telomere length. Particularly, black populations seems to have longer telomere length than white populations (50–53). Of note, one study described similar telomere length between healthy black female and male newborns, as we observed in this study (52), although this observation was not found in another one which showed longer telomere length among females (54). Larger studies are clearly warranted to investigate both gender and ethnic difference on telomere length in newborns and children. Another limitation of our study is that, interestingly, telomere length at day-7 was around two third lower for CHEU from South Africa as compared to those from the three other sites. To date, no study reported such difference between countries because none of them were multicentric. A recent study evaluated telomere length among seven Sub-Saharan populations (two ancestries from Botswana and Tanzania and three ancestries from Ethiopia) and showed that the San ancestry population from Botswana had the higher telomere length than the six others populations. Thirdly, we could not assess with accuracy when telomere shortening occurred after the first year of life because we did not have intermediate time point between the first and sixth years of life. Fourthly, some information were self-reported: “previous clinical consultations” or “hospital admissions”, “smoking during pregnancy and breastfeeding”, “alcohol consumption during pregnancy”, “type of income” and “education of the mother”. We also lack information on well-known factors associated with telomere shortening such as paternal age (55–57), consumption of drugs of addiction (58–60) and cytomegalovirus infection (61). Finally, we could not perform long-term follow of CHEU from South Africa because samples were not collect and store.

In conclusion, we showed good acute and overall long-term safety of the use of a one-year 3TC or LPV/r infant prophylaxis to prevent mother-to-child transmission of HIV during breastfeeding regarding telomere length. However, the observation of motor impairment at year-6 deserved further attention for CHEU but also for HIV-infected children with long-term exposure to 3TC or LPV/r as therapy.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

Conceptualization, N.N., T.T., P.V.d.P., and J.-P.M.; methodology, S.E-D. and N.N.; validation S.E-D. and J.-P.M.; formal analysis, A.M. and S.E-D.; investigation, A.M., A.V., N.M., M.S-M., G.N and J.K.T., C.K., A.G.; data curation, A.M. and S.E-D.; writing—original draft preparation, A.M., A.V., N.N., and J.-P.M.; writing—review and editing, A.M., A.V., N.N., S.E-D., N.M., G.N, J.K.T., A.G., T.T., P.V.d.P., and J.-P.M.; supervision, N.M., M.S-M., G.N, J.K.T, C.K. and A.G.; funding acquisition, N.N., P.V.d.P., T.T., and J.-P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

The PROMISE-PEP trial was supported by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS#12274), the European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (#CT.2006.33020.004), and the Research Council of Norway (GlobVac grant # 183600). The PROMISE M&S trial was funded by the Pierre Bergé endowment fund in collaboration with SIDACTION, grant number AP-FPB-2013-2/09, and sponsored by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS#12174 and ANRS12341). A.M. is the beneficiary of a doctoral scholarship from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS12174-B90). The funders had no role in the study design and collection, analysis, and interpretation of the results.

List of abbreviations

3TC: lamivudine

ARV: antiretroviral

CHEU: children who are HIV-exposed uninfected

CHUU: children who are HIV-unexposed uninfected

LPV/r: lopinavir/ritonavir

PrEP: pre-exposure prophylaxis

Acknowledgment

We would like to thank all the participating mothers, children, and caregivers, and all the members of the PROMISE Consortium.

Reference

1. Ahmed I, Lemma S. Mortality among pediatric patients on HIV treatment in sub-Saharan African countries: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* (2019) **19**: doi:10.1186/s12889-019-6482-1
2. Slogrove AL, Goetghebuer T, Cotton MF, Singer J, Bettinger JA. Pattern of infectious morbidity in HIV-exposed uninfected infants and children. *Front Immunol* (2016) **7**:

doi:10.3389/fimmu.2016.00164

3. Brennan AT, Bonawitz R, Gill CJ, Thea DM, Kleinman M, Useem J, Garrison L, Ceccarelli R, Udokwu C, Long L, et al. A meta-analysis assessing all-cause mortality in HIV-exposed uninfected compared with HIV-unexposed uninfected infants and children. *AIDS* (2016) **30**:2351–2360. doi:10.1097/QAD.0000000000001211
4. Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers (Basel)* (2020) **12**: doi:10.3390/cancers12030558
5. Turner K, Vasu V, Griffin D. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells* (2019) **8**:73. doi:10.3390/cells8010073
6. Martens DS, Janssen BG, Bijnsens EM, Clemente DBP, Vineis P, Plusquin M, Nawrot TS. Association of Parental Socioeconomic Status and Newborn Telomere Length. *JAMA Netw open* (2020) **3**:e204057. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.4057
7. Bellon M, Nicot C. Telomere Dynamics in Immune Senescence and Exhaustion Triggered by Chronic Viral Infection. *Viruses* (2017) **9**: doi:10.3390/v9100289
8. Pace GW, Leaf CD. The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic Biol Med* (1995) **19**:523–528. doi:10.1016/0891-5849(95)00047-2
9. Deeks SG, Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK, Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E, Simmons RP, et al. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Aids* (2013) **27**:1263–1272. doi:10.1146/annurev-med-042909-093756.HIV
10. Taura M, Kariya R, Kudo E, Goto H, Iwawaki T, Amano M, Suico MA, Kai H, Mitsuya H, Okada S. Comparative analysis of ER stress response into HIV protease inhibitors: Lopinavir but not darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway. *Free Radic Biol Med* (2013) **65**:778–788. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.161
11. Gratton R, Tricarico PM, Guimaraes RL, Celsi F, Crovella S. Lopinavir/Ritonavir Treatment Induces Oxidative Stress and Caspaseindependent Apoptosis in Human Glioblastoma U-87 MG Cell Line. *Curr HIV Res* (2018) **16**:106–112. doi:10.2174/1570162X16666180528100922
12. Xiang T, Du L, Pham P, Zhu B, Jiang S. Nelfinavir, an HIV protease inhibitor, induces apoptosis and cell cycle arrest in human cervical cancer cells via the ROS-dependent mitochondrial pathway. *Cancer Lett* (2015) **364**:79–88. doi:10.1016/j.canlet.2015.04.027
13. Gibellini L, De Biasi S, Pinti M, Nasi M, Riccio M, Carnevale G, Cavallini GM, Sala De Oyanguren FJ, O'Connor JE, Mussini C, et al. The protease inhibitor atazanavir triggers autophagy and mitophagy in human preadipocytes. *AIDS* (2012) **26**:2017–2026. doi:10.1097/QAD.0b013e328359b8be
14. Ganta KK, Chaubey B. Endoplasmic reticulum stress leads to mitochondria-mediated apoptosis in cells treated with anti-HIV protease inhibitor ritonavir. *Cell Biol Toxicol* (2019) **35**:189–204. doi:10.1007/s10565-018-09451-7
15. Blas-García A, Martí-Rodrigo A, Víctor VM, Polo M, Alegre F, Funes HA, Apostolova N, Esplugues J V. The purine analogues abacavir and didanosine increase acetaminophen-induced hepatotoxicity by enhancing mitochondrial dysfunction. *J Antimicrob Chemother* (2016) **71**:916–926. doi:10.1093/jac/dkv424
16. Velsor LW, Kovacevic M, Goldstein M, Leitner HM, Lewis W, Day BJ. Mitochondrial

- oxidative stress in human hepatoma cells exposed to stavudine. *Toxicol Appl Pharmacol* (2004) **199**:
17. Day BJ, Lewis W. Oxidative stress in NRTI-induced toxicity: Evidence from clinical experience and experiments in vitro and in vivo. *Cardiovasc Toxicol* (2004) **4**:207–216. doi:10.1385/CT:4:3:207
 18. Smith RL, Tan JME, Jonker MJ, Jongejan A, Buissink T, Veldhuijzen S, Van Kampen AHC, Brul S, Van Der Spek H. Beyond the polymerase- γ theory: Production of ROS as a mode of NRTI-induced mitochondrial toxicity. *PLoS One* (2017) **12**: doi:10.1371/journal.pone.0187424
 19. Hsieh AYY, Kimmel E, Pick N, Sauvé L, Brophy J, Kakkar F, Bitnun A, Murray MCM, Côté HCF. Inverse relationship between leukocyte telomere length attrition and blood mitochondrial DNA content loss over time. *Aging (Albany NY)* (2020) **12**:1–26. doi:10.18632/aging.103703
 20. Nichols WS, Schneider S, Chan RCK, Farthing CF, Daar ES. Increased CD4+ T-lymphocyte senescence fraction in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. *Scand J Immunol* (1999) **49**:302–306. doi:10.1046/j.1365-3083.1999.00505.x
 21. Minami R, Takahama S, Yamamoto M. Correlates of telomere length shortening in peripheral leukocytes of HIV-infected individuals and association with leukoaraiosis. *PLoS One* (2019) **14**:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0218996
 22. Babu H, Ambikan AT, Gabriel EE, Akusjärvi SS, Palaniappan AN, Sundaraj V, Mupanni NR, Sperk M, Cheedarla N, Sridhar R, et al. Systemic inflammation and the increased risk of inflamm-aging and age-associated diseases in people living with HIV on long term suppressive antiretroviral therapy. *Front Immunol* (2019) **10**:1–11. doi:10.3389/fimmu.2019.01965
 23. Pathai S, Lawn SD, Gilbert CE, McGuinness D, McGlynn L, Weiss HA, Port J, Christ T, Barclay K, Wood R, et al. Accelerated biological ageing in HIV-infected individuals in South Africa: A case-control study. *Aids* (2013) **27**:2375–2384. doi:10.1097/QAD.0b013e328363bf7f
 24. Liu JCY, Leung JM, Ngan DA, Nashta NF, Guillemi S, Harris M, Lima VD, Um SJ, Li Y, Tam S, et al. Absolute leukocyte telomere length in HIV-infected and uninfected individuals: Evidence of accelerated cell senescence in HIV-associated chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* (2015) **10**:1–13. doi:10.1371/journal.pone.0124426
 25. UNAIDS. AIDSinfo | UNAIDS. Available at: <https://aidsinfo.unaids.org/> [Accessed November 24, 2020]
 26. Ganesin K, Noguera-Julian A, Zanchetta M, Del Bianco P, Petrara MR, Freguja R, Rampon O, Fortuny C, Camós M, Mozzo E, et al. Premature aging and immune senescence in HIV-infected children. *AIDS* (2016) **30**:1363–1373. doi:10.1097/QAD.0000000000001093
 27. Côté HCF, Soudeyns H, Thorne A, Alimenti A, Lamarre V, Maan EJ, Sattha B, Singer J, Lapointe N, Money DM, et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected and HIV-Exposed uninfected children: Shorter telomeres with uncontrolled HIV viremia. *PLoS One* (2012) **7**: doi:10.1371/journal.pone.0039266
 28. Poirier MC, Divi RL, Al-Harhi L, Olivero OA, Nguyen V, Walker B, Landay AL, Walker VE, Charurat M, Blattner WA. Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2003) **33**:175–183. doi:10.1097/00126334-200306010-00010

29. Imam T, Jitratkosol MHJ, Soudeyns H, Saththa B, Gadawski I, Maan E, Forbes JC, Alimenti A, Lapointe N, Lamarre V, et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected pregnant women treated with antiretroviral drugs during pregnancy and their uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2012) **60**:495–502. doi:10.1097/QAI.0b013e31825aa89c
30. Ajaykumar A, Soudeyns H, Kakkar F, Brophy J, Bitnun A, Alimenti A, Albert A, Money DM, Côté HCF, Children CT in CA and HIVC in W and, et al. Leukocyte Telomere Length at Birth and During the Early Life of Children Exposed to but Uninfected With HIV After In Utero Exposure to Antiretrovirals. *J Infect Dis* (2018) **217**:710–720. doi:10.1093/infdis/jix618
31. Shiau S, Strehlau R, Shen J, Violari A, Patel F, Liberty A, Foca M, Wang S, Terry MB, Yin MT, et al. Biomarkers of Aging in HIV-Infected Children on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2018) **78**:549–556. doi:10.1097/QAI.0000000000001714
32. Saberi S, Kalloger SE, Zhu MMT, Saththa B, Maan EJ, van Schalkwyk J, Money DM, Côté HCF. Dynamics of leukocyte telomere length in pregnant women living with HIV, and HIV-negative pregnant women: A longitudinal observational study. *PLoS One* (2019) **14**: doi:10.1371/journal.pone.0212273
33. Nagot N, Kankasa C, Meda N, Hofmeyr J, Nikodem C, Tumwine JK, Karamagi C, Sommerfelt H, Neveu D, Tylleskär T, et al. Lopinavir/Ritonavir versus Lamivudine peri-exposure prophylaxis to prevent HIV-1 transmission by breastfeeding: the PROMISE-PEP trial Protocol ANRS 12174. *BMC Infect Dis* (2012) **12**:246. doi:10.1186/1471-2334-12-246
34. Nagot N, Kankasa C, Tumwine JK, Meda N, Hofmeyr GJ, Vallo R, Mwiya M, Kwagala M, Traore H, Sunday A, et al. Extended pre-exposure prophylaxis with lopinavir-ritonavir versus lamivudine to prevent HIV-1 transmission through breastfeeding up to 50 weeks in infants in Africa (ANRS 12174): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* (2016) **387**:566–573. doi:10.1016/S0140-6736(15)00984-8
35. Monnin A, Nagot N, Peries M, Vallo R, Meda N, Singata-madliki M, Tumwine JK, Kankasa C, Ngandu N, Goga A, et al. Mitochondrial DNA Parameters in Blood of Infants Receiving Lopinavir / Ritonavir or Lamivudine Prophylaxis to Prevent Breastfeeding Transmission of HIV-1. *J Clin Med* (2020) **9**:1–19.
36. Goga A, Jackson D, Singh M, Lombard C, Noveve N, Singh Y, Magasana V, Ramraj T, Ramokolo V, Ngandu N, et al. Early (4-8 postpartum) population-level effectiveness of WHO PMTCT Option A, South Africa, 2012-2013. (2015).
37. O’Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* (2011) **13**:3. doi:10.1186/1480-9222-13-3
38. Fehrer C, Voglauer R, Wieser M, Pfister G, Brunauer R, Cioca D, Grubeck-Loebenstien B, Lepperdinger G. Techniques in gerontology: Cell lines as standards for telomere length and telomerase activity assessment. *Exp Gerontol* (2006) **41**:648–651. doi:10.1016/j.exger.2006.03.016
39. Infant Peri-Exposure Prophylaxis to Prevent HIV-1 Transmission by Breastfeeding: Mechanisms & Safety. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03519503?term=ANRS12341&draw=2&rank=1> [Accessed November 16, 2020]

40. Monnin A, Nagot N, Eymard-Duvernay S, Meda N, Tumwine JK, Tylleskär T, Perre P Van de, Molès J-P. Health Outcomes at School Age among Children Who Are HIV-Exposed but Uninfected with Detected Mitochondrial DNA Depletion at One Year. *J Clin Med* (2020) **9**:3680. doi:10.3390/jcm9113680
41. Stout SA, Lin J, Hernandez N, Davis EP, Blackburn E, Carroll JE, Glynn LM. Validation of minimally-invasive sample collection methods for measurement of telomere length. *Front Aging Neurosci* (2017) **9**: doi:10.3389/fnagi.2017.00397
42. Zanet DAL, Saberi S, Oliveira L, Sattha B, Gadawski I, Côté HCF. Blood and Dried Blood Spot Telomere Length Measurement by qPCR: Assay Considerations. *PLoS One* (2013) **8**: doi:10.1371/journal.pone.0057787
43. Astuti Y, Wardhana A, Watkins J, Wulaningsih W. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ Res* (2017) **158**:480–489. doi:10.1016/j.envres.2017.06.038
44. Barrett ELB, Richardson DS. Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell* (2011) **10**:913–921. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00741.x
45. Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, Martin-Ruiz C, Shiels P, Sayer AA, Barbieri M, et al. Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol* (2014) **51**:15–27. doi:10.1016/j.exger.2013.12.004
46. Factor-Litvak P, Susser E, Kezios K, McKeague I, Kark JD, Hoffman M, Kimura M, Wapner R, Aviv A. Leukocyte Telomere Length in Newborns: Implications for the Role of Telomeres in Human Disease. *Pediatrics* (2016) **137**: doi:10.1542/peds.2015-3927
47. Wojcicki JM, Olveda R, Heyman MB, Elwan D, Lin J, Blackburn E, Epel E. Cord blood telomere length in Latino infants: Relation with maternal education and infant sex. *J Perinatol* (2016) **36**:235–241. doi:10.1038/jp.2015.178
48. Okuda K, Bardeguet A, Gardner JP, Rodriguez P, Ganesh V, Kimura M, Skurnick J, Awad G, Aviv A. Telomere length in the newborn. *Pediatr Res* (2002) **52**:377–381. doi:10.1203/00006450-200209000-00012
49. Aubert G, Baerlocher GM, Vulto I, Poon SS, Lansdorp PM. Collapse of Telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in Telomerase genes. *PLoS Genet* (2012) **8**: doi:10.1371/journal.pgen.1002696
50. Hunt SC, Chen W, Gardner JP, Kimura M, Srinivasan SR, Eckfeldt JH, Berenson GS, Aviv A. Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: The National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study. *Aging Cell* (2008) **7**:451–458. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00397.x
51. Zhu H, Wang X, Gutin B, Davis CL, Keeton D, Thomas J, Stallmann-Jorgensen I, Mookken G, Bundy V, Snieder H, et al. Leukocyte telomere length in healthy caucasian and african-american adolescents: Relationships with race, sex, adiposity, adipokines, and physical activity. *J Pediatr* (2011) **158**:215–220. doi:10.1016/j.jpeds.2010.08.007
52. Rewak M, Buka S, Prescott J, De Vivo I, Loucks EB, Kawachi I, Non AL, Kubzansky LD. Race-related health disparities and biological aging: Does rate of telomere shortening differ across blacks and whites? *Biol Psychol* (2014) **99**:92–99. doi:10.1016/j.biopsycho.2014.03.007

53. Hansen MEB, Hunt SC, Stone RC, Horvath K, Herbig U, Ranciaro A, Hirbo J, Beggs W, Reiner AP, Wilson JG, et al. Shorter telomere length in Europeans than in Africans due to polygenetic adaptation. *Hum Mol Genet* (2016) **25**:2324–2330. doi:10.1093/hmg/ddw070
54. Drury SS, Esteves K, Hatch V, Woodbury M, Borne S, Adamski A, Theall KP. Setting the trajectory: Racial disparities in newborn telomere length. *J Pediatr* (2015) **166**:1181–1186. doi:10.1016/j.jpeds.2015.01.003
55. Nordfjäll K, Svenson U, Norrback K-F, Adolfsson R, Roos G. Large-scale parent-child comparison confirms a strong paternal influence on telomere length. *Eur J Hum Genet EJHG* (2010) **18**:385–389. doi:10.1038/ejhg.2009.178
56. De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Van Criekinge W, De Backer GG, Gillebert TC, Van Oostveldt P, Bekaert S, investigators A. Paternal age at birth is an important determinant of offspring telomere length. *Hum Mol Genet* (2007) **16**:3097–3102. doi:10.1093/hmg/ddm271
57. Eisenberg DTA, Lee NR, Rej PH, Hayes MG, Kuzawa CW. Older paternal ages and grandpaternal ages at conception predict longer telomeres in human descendants. *Proc R Soc B Biol Sci* (2019) **286**: doi:10.1098/rspb.2019.0800
58. Yang Z, Ye J, Li C, Zhou D, Shen Q, Wu J, Cao L, Wang T, Cui D, He S, et al. Drug addiction is associated with leukocyte telomere length. *Sci Rep* (2013) **3**:1542. doi:10.1038/srep01542
59. Cheng GLF, Zeng H, Leung M-K, Zhang H-J, Lau BWM, Liu Y-P, Liu G-X, Sham PC, Chan CCH, So K-F, et al. Heroin abuse accelerates biological aging: a novel insight from telomerase and brain imaging interaction. *Transl Psychiatry* (2013) **3**:e260–e260. doi:10.1038/tp.2013.36
60. Levandowski ML, Tractenberg SG, de Azeredo LA, De Nardi T, Rovaris DL, Bau CHD, Rizzo LB, Maurya PK, Brietzke E, Tyrka AR, et al. Crack cocaine addiction, early life stress and accelerated cellular aging among women. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* (2016) **71**:83–89. doi:10.1016/j.pnpbp.2016.06.009
61. van de Berg PJEJ, Griffiths SJ, Yong S-L, Macaulay R, Bemelman FJ, Jackson S, Henson SM, ten Berge IJM, Akbar AN, van Lier RAW. Cytomegalovirus Infection Reduces Telomere Length of the Circulating T Cell Pool. *J Immunol* (2010) **184**:3417–3423. doi:10.4049/jimmunol.0903442

Table 1. Children's characteristics at randomization (day-7)

Characteristics	LPV/r (n=75)	3TC (n=92)	Total (n=167)	p value ^a
<i>Socio-demography</i>				
Site; n (%)				0.40
Burkina Faso	21 (28.0)	23 (25.0)	44 (26.4)	
South Africa	13 (17.3)	26 (28.3)	39 (23.4)	
Uganda	20 (26.7)	23 (25.0)	43 (25.7)	
Zambia	21 (28.0)	20 (21.7)	41 (24.6)	
Gender; n (%)				0.59
Boy	36 (48.0)	48 (52.2)	84 (50.3)	
<i>Anthropometry</i>				
Weight (kg); mean ± SD	3.2 ± 0.5 [†]	3.3 ± 0.4	3.3 ± 0.5 [†]	0.21
Height (cm); mean ± SD	49.4 ± 2.1	49.7 ± 1.9	49.6 ± 2.0	0.38
WAZ; mean ± SD	-0.8 ± 1.3 [§]	-0.6 ± 1.2 [†]	-0.7 ± 1.3 [‡]	0.21
HAZ; mean ± SD	-1.0 ± 1.1 [£]	-0.8 ± 1.1 [£]	-0.9 ± 1.1 [§]	0.32
WHZ; mean ± SD	-0.5 ± 1.4 [§]	-0.3 ± 1.3 [£]	-0.4 ± 1.3 ^υ	0.40
Underweight (WAZ<-2); n (%)	13 (18.3) [§]	12 (13.2) [†]	25 (15.4) [‡]	0.37
Stunting (HAZ<-2); n (%)	15 (20.6) [£]	10 (11.1) [£]	25 (15.3) [§]	0.10
Wasting (WHZ<- 2); n (%)	10 (14.1) [§]	7 (7.8) [£]	17 (10.6) ^υ	0.20
Gestational age (week); median [IQR]	38.0 [38.0;40.0]	38.0 [38.0;40.0]	38.0 [38.0;40.0]	0.37
Preterm birth (week); n (%)				0.47
No prematurity ≥37	65 (86.7)	83 (90.2)	148 (88.6)	
Prematurity <37	10 (13.3)	9 (9.8)	19 (11.4)	
<i>Hematology</i>				
Hæmoglobin (g/dL); mean ± SD	15.7 ± 2.1	15.8 ± 2.2 [£]	15.8 ± 2.1 [£]	0.82
Haemoglobin (g/dL); n (%)				0.52
Normal >13	70 (93.3)	83 (91.2) [†]	153 (92.2) [†]	
Anemia ≤13	5 (6.7)	8 (8.8) [†]	13 (7.8) [†]	
Mild [12;13]	4 (5.3)	6 (6.6) [†]	10 (6.0) [†]	
Moderate [10;12[-	2 (2.2) [†]	2 (1.2) [†]	
Very severe [0;9[1 (1.3)	-	1 (0.6) [†]	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.18
Normal ≥125	68 (90.7)	84 (96.6) [‡]	152 (93.8) [‡]	
Thrombocytopenia <125	7 (9.3)	3 (3.4) [‡]	10 (6.2) [‡]	
Mild [100;125[5 (6.7)	2 (2.3) [‡]	7 (4.3) [‡]	
Moderate [50;100[1 (1.3)	-	1 (0.6) [‡]	
Severe [25;50[-	1 (1.1) [‡]	1 (0.6) [‡]	
Very severe [0;25[1 (1.3)	-	1 (0.6) [‡]	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >2.5	75 (100.0)	91 (100.0) [£]	166 (100.0) [£]	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.37
Normal >1.5	71 (94.7)	87 (97.8) [§]	158 (96.3) [§]	
Neutropenia ≤1.5	4 (5.3)	2 (2.3) [§]	6 (3.6) [§]	

Mild [1.25;1.5]	2 (2.7)	2 (2.3) [§]	4 (2.4) [§]
Moderate [1.0;1.25[2 (2.7)	-	2 (1.2) [§]

† one missing value, § three missing values, ‡ five missing values, £ two missing values, ¯ six missing values, ¨ three missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Student's t-test or Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: SD, standard deviation; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; WAZ, weight-for-age Z-score, HAZ, height-for-age Z-score; WHZ, weight-for-height Z-score, NA non-applicable.

Table 2. Maternal characteristics at randomisation (day-7) and during follow up of the PROMISE PEP trial

Characteristics	LPV/r (n=75)	3TC (n=92)	Total (n=167)	p value ^a
At randomisation (day-7)				
<i>Socio-demographic characteristics</i>				
Age (year); mean \pm SD	29.6 \pm 5.6	28.6 \pm 5.4	29.0 \pm 5.5	0.25
Parity; median [IQR]	3.0 [2.0;4.0]	3.0 [1.0;4.0]	3.0 [2.0;4.0]	0.21
<i>Education</i>				
Mother/caregiver ever attended school; n (%)				0.11
Yes	56 (80.0) [†]	74 (89.2) [§]	130 (85.0) [‡]	
<i>Economic status</i>				
Type of income; n (%)				0.11
No income generating activities	15 (21.4) [†]	13 (15.7) [§]	28 (18.3) [‡]	
Irregular income	36 (51.4) [†]	34 (41.0) [§]	70 (45.8) [‡]	
Regular income	19 (27.1) [†]	36 (43.4) [§]	55 (34.0) [‡]	
<i>Clinical and biological characteristics</i>				
BMI; median [IQR]	23.9 [21.7;26.4]	23.9 [21.5;28.0]	23.9 [21.4;27.4]	0.51
CD4 cells count (cells/mm ³); median [IQR]	490.0 [424.0;601.0]	495.0 [430;589.0]	494.0 [428.0;595.0]	0.99
HIV viral load control; n (%)				0.52
<1000 copies/mL	42 (56.0)	57 (62.6) ^ε	99 (59.6) ^ε	
\geq 1000 copies/mL	33 (44.0)	34 (37.4) ^ε	67 (40.4) ^ε	
WHO HIV staging; n (%)				0.69
Stage 1	73 (97.3)	88 (95.6)	161 (96.4)	
Stage 2	2 (2.7)	4 (4.4)	6 (3.6)	
<i>Maternal prophylaxis during pregnancy</i>				
ARV regimen; n (%)				0.22
ZDV	65 (86.7)	79 (85.9)	144 (86.2)	
ZDV+3TC	5 (6.7)	11 (12.0)	16 (9.6)	
No ARV	5 (6.7)	2 (2.2)	7 (4.2)	
Duration of ARV prophylaxis taken during pregnancy (week); median [IQR]	10.0 [7.0;12.0]	8.0 [5.0;12.0]	9.0 [5.5;12.0]	0.19

During the PROMISE PEP trial				
HIV viral load at week-38 (Log copies/mL); median [IQR]	4.0 [2.7;5.0] [§]	4.0 [2.2;4.7] ^o	4.0 [2.5;4.8] ^g	0.58
HIV viral load control at week-38; n (%)				0.62
<1000 copies/mL	20 (30.3) [§]	24 (31.6) ^o	44 (31.0) ^g	
≥1000 copies/mL	46 (69.7) [§]	52 (68.4) ^o	98 (69.0) ^g	
Duration of breastfeeding (week); median [IQR]	41.7 [33.7;45.7]	43.4 [37.3;47.9]	42.4 [35.9;47.0]	0.08
Smoking during pregnancy; n (%)				1.00
No	62 (98.4) ^o	73 (97.3) [¥]	135 (97.8) ^Σ	
Smoking during breastfeeding; n (%)				1.00
No	62 (98.4) ^o	74 (98.7) [¥]	136 (98.6) ^Σ	
Alcohol consumption during pregnancy; n (%)				0.56
Yes	24 (38.1) ^o	25 (33.3) [¥]	49 (35.5) ^Σ	

† five missing values, § nine missing values, ‡ fourteen missing values, £ one missing value, o eighteen missing values, g twenty-five missing values, o twelve missing values, ¥ seventeen missing values, Σ twenty-nine missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Student's t-test or Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; BMI, body mass index; HIV, Human immunodeficiency virus; WHO, World Health Organization; ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine.

Table 3. Children' telomere length at day-7

Site	PrEP*	n	Telomere length at day-7 (kb/cell) median [IQR]	p value ^a
Burkina Faso	Any	44	335 [178;463]	0.50
	LPV/r	21	293 [131;424]	
	3TC	23	360 [231;467]	
South Africa	Any	39	131 [112;148]	0.65
	LPV/r	13	123 [79;149]	
	3TC	26	132 [112;147]	
Uganda	Any	43	391 [268;485]	0.34
	LPV/r	20	420 [254;529]	
	3TC	23	348 [268;447]	
Zambia	Any	41	331 [268;445]	0.63
	LPV/r	21	331 [295;402]	
	3TC	20	321 [179;461]	
All	Any	167	294 [144;438]	0.29
	LPV/r	75	321 [152;445]	
	3TC	92	270 [137;434]	

*Telomere measurement was performed on blood collected after randomization but before the administration of the first ARV prophylaxis dose. ^aWilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: PrEP, pre-exposure prophylaxis; kb, kilobase; IQR, interquartile range; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine.

Table 4. Telomere length at week-50 and proportion of CHEU with telomere shortening at week-50

Site	PrEP	n	Telomere length at week-50 (kb/cell) Median [IQR]	p value ^a	Children with telomere shortening at week-50 n (%)	p value ^b
Burkina Faso	Any	44	333 [193;463]	0.69	17 (38.6)	0.24
	LPV/r	21	292 [195;483]		10 (47.6)	
	3TC	23	382 [191;442]		7 (30.4)	
South Africa	Any	39	131 [108;150]	0.73	17 (43.6)	0.65
	LPV/r	13	125 [110;152]		5 (38.5)	
	3TC	26	137 [108;148]		12 (46.2)	
Uganda	Any	43	332 [266;431]	0.91	25 (58.1)	0.82
	LPV/r	20	323 [292;431]		12 (60.0)	
	3TC	23	346 [266;434]		13 (56.5)	
Zambia	Any	41	345 [266;448]	0.95	15 (36.6)	0.66
	LPV/r	21	345 [302;433]		7 (33.3)	
	3TC	20	338 [194;498]		8 (40.0)	
All	Any	167	294 [141;417]	0.37	74 (44.3)	0.81
	LPV/r	75	305 [161;430]		34 (45.3)	
	3TC	92	267 [139;417]		40 (43.5)	

^aWilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. ^bChi-square test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: CHEU, children who are HIV-exposed uninfected; PrEP, pre-exposure prophylaxis; kb, kilobase; IQR, interquartile range; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine.

Table 5. Telomere shortening between week-6 and week-50 in South African CHEU from the control and the PrEP groups

Group	PrEP	n	CHEU with telomere shortening between week-6 and week-50
			n (%)
Control	No	37	12 (32.4)
PrEP	Yes	33	4 (12.1)

Abbreviations: PrEP, pre-exposure prophylaxis; CHEU, children who are HIV-exposed uninfected.

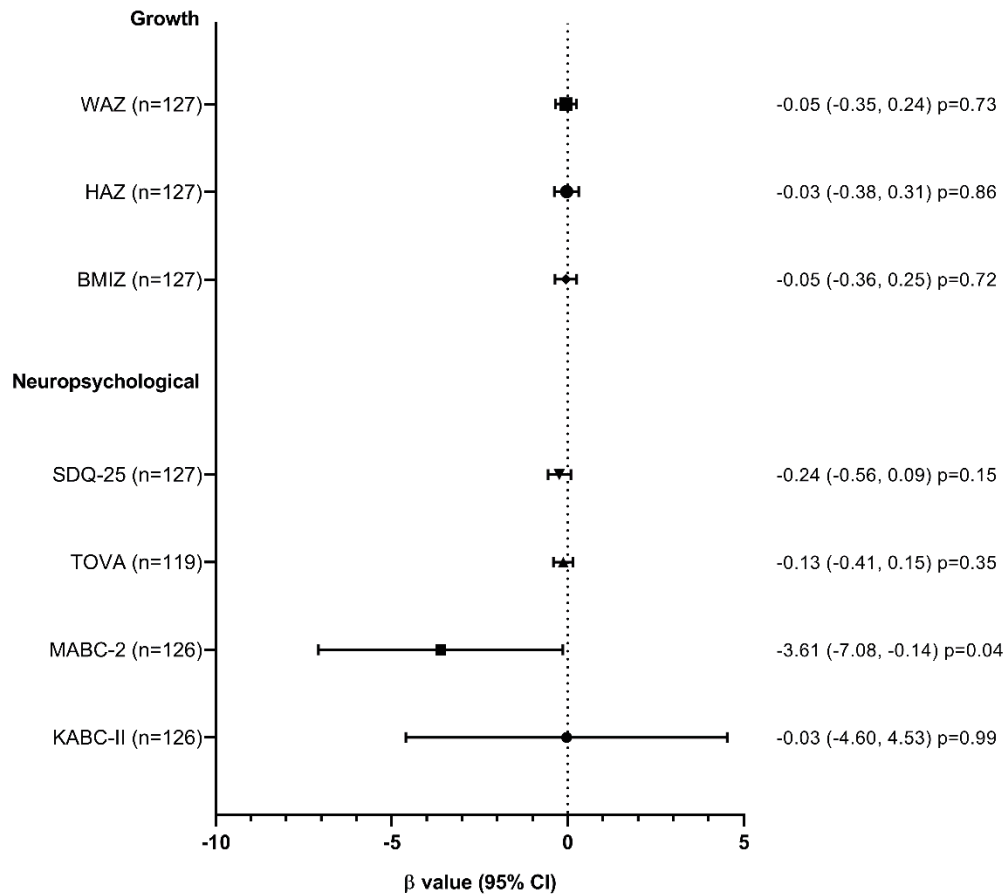


Figure 1. Forest plot of the association between growth and neuropsychological outcomes at year-6 with telomere shortening at week-50, assessed by linear regressions. β value and confidence interval are shown. Final global scores for the SDQ-25, TOVA, MABC-2 and KABC-II neuropsychological tests are presented. SDQ-25 score was squared-transformed. Positive β were associated with better performance for MABC-2 and KABC-II tests while they were associated with poorer performances for SDQ-25 and TOVA test. Growth analyses were adjusted for the prophylaxis, the age of the child, the gender, the study site, the type of income generating activities, the education of the mother and the number of children under five years old living in the household. Neuropsychological analyses were adjusted for the same cofounders plus the child weight and height at year-6. Abbreviations: WAZ, weight-for-age Z-score; HAZ, height-for-age Z-score; BMIZ, body mass index Z-score; SDQ-25, Strength and Difficulties Questionnaire; TOVA, Test of Variable Of Attention; MABC-2, Movement Assessment Battery for Children second edition; KABC-II, Kaufman Assessment Battery for Children second edition; CI, confidence interval.

Discussion et perspectives

L'essai PROMISE PEP conduit dans quatre pays d'Afrique Sub-Saharienne visait à évaluer l'efficacité et l'innocuité d'une prophylaxie ARV prolongée à base de LPV/r ou de 3TC, administrée à des nourrissons nés de mères infectées par le VIH pour prévenir la TME de celui-ci par l'allaitement.

Les travaux de cette thèse ont porté sur ces enfants que nous avons pu suivre jusqu'à l'âge de 6 ans grâce à l'essai PROMISE M&S qui a consisté à rappeler les CHEU initialement suivis au cours de leur première année de vie. Nous avons mené une évaluation à court terme (du septième jour après la naissance à un an) et à long terme (6 ans) des toxicités génomiques de ces deux prophylaxies ARV, à la fois sur l'ADNmt et sur les télomères, et également recherché l'association entre la déplétion de l'ADNmt et l'attrition télomérique observées à la fin de l'exposition ARV et leur croissance et développement neurocognitif à 6 ans.

Dans cette dernière partie de thèse, nous rappellerons dans un premier temps les principaux résultats obtenus puis discuterons de ces derniers.

I. Synthèse des principaux résultats

L'analyse de la toxicité mitochondriale aiguë du LPV/r et du 3TC a montré une prévalence importante (42.7%) de CHEU présentant une déplétion de l'ADNmt (diminution du nombre de copies supérieure ou égale à 50% entre D7 et W50) à la fin de l'exposition à la prophylaxie ARV (W50), sans différence significative entre le LPV/r et le 3TC. L'absence de différence entre ces deux prophylaxies offrait deux possibilités : soit aucune des deux n'étaient à l'origine de la déplétion observée, soit elles en étaient l'agent causal. Afin de discriminer ces deux possibilités, nous avons effectué une sous-analyse en Afrique du Sud incluant des CHEU n'ayant pas reçu de prophylaxie ARV et dont les mères n'étaient pas sous traitement pendant leur grossesse. Nous avons montré que les deux prophylaxies étaient associées à une déplétion de l'ADNmt au cours des six premiers mois, les risques relatifs entre les deux molécules ARV n'étant pas sensiblement différents avec 1.54 (%CI : 1.00-2.37 ; $p = 0.05$) pour le 3TC et 1.75 (%CI : 1.15-2.68 ; $p < 0.01$) pour le LPV/r. Nous avons également mis en évidence un effet du genre sur la déplétion de l'ADNmt, les garçons présentant un risque relatif de 1.39 (95%CI : 1.05-1.84 ; $p = 0.02$) comparé aux filles. Par ailleurs, nous avons observé que la quasi-totalité des CHEU présentait une délétion de l'ADNmt, aussi bien à D7 qu'à W50.

L'analyse de la toxicité mitochondriale sur le long terme s'est montrée doublement rassurante. D'une part, la déplétion de l'ADNmt que nous avons observée chez les CHEU à la fin de l'exposition à la prophylaxie (W50) ne persistait plus à l'âge de 6 ans, à l'exception d'un enfant ayant reçu du 3TC. D'autre part, les mesures anthropométriques (Z-scores poids-pour-âge, poids-pour-taille et indice de masse corporelle), les capacités motrices (test MABC-2) ainsi que les examens neurologiques évaluant la santé mentale de l'enfant (test SDQ-25), en particulier leurs fonctions cognitives (tests KABC-II et TOVA) et mémorielle (test KABC-II), ne se trouvaient pas associées à cette déplétion à 6 ans.

Enfin, l'analyse de la longueur des télomères a montré une prévalence de 44.3% de CHEU présentant un raccourcissement télomérique à la fin de l'exposition à la prophylaxie ARV, bien que la longueur des télomères était dans son ensemble stable pendant cette période avant d'entamer une décroissance jusqu'à l'âge de 6 ans. La sous-analyse en Afrique du Sud a montré que la prophylaxie ARV n'était pas associée à cette attrition avec un risque relatif de 0.35 (95%CI : 0.10-1.24 ; $p = 0.10$). De façon similaire à l'étude de la toxicité mitochondriale, nous avons également montré que cette attrition des télomères au cours de la première année de vie n'était pas associée à de moins bons indicateurs relatifs à la croissance et au développement neuro-psychomoteur de l'enfant à 6 ans.

II. Discussion générale et perspectives

1. Toxicité mitochondriale : effet du LPV/r

D'une façon générale, le choix des prophylaxies ARV administrées aux CHEU se doit de prendre en compte un certain nombre de prérequis incluant notamment l'existence d'une formulation pédiatrique associée à une bonne palatabilité, une bonne innocuité générale ainsi qu'une meilleure génotoxicité comparativement à l'AZT, une longue demi-vie aussi bien dans le plasma que dans les cellules, une forte barrière génétique minimisant le risque d'émergence de souches VIH résistantes (en cas d'échec de la prophylaxie), mais également être accessible en terme de coût, en particulier dans les pays à ressources limitées. Les ARV choisis dans le cadre de l'essai PROMISE PEP incluaient cette démarche et remplissaient la quasi-totalité de ces critères.

Si l'analyse de la toxicité génomique du 3TC et du LPV/r se veut rassurante sur la longueur des télomères, l'observation d'une association entre le LPV/r et la déplétion de l'ADNmt nous a interpellée. En effet, si la toxicité mitochondriale des INTI, dont le 3TC fait partie, est avérée et bien décrite dans la littérature^{299,300,306}, les IP comme le LPV/r ne sont quant à eux pas particulièrement connus pour entraîner une telle génotoxicité chez les individus infectés par le VIH et traités par cet ARV et encore moins chez les enfants infectés par le VIH dont la première ligne de traitement intègre le LPV/r. Le groupe de Taura et al. a néanmoins montré *in vitro* que le LPV était le plus puissant inducteur d'ERO dans les PBMC mais également dans plusieurs lignées cellulaires³²⁷. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la toxicité mitochondriale associée au LPV/r que nous avons observé dans notre étude puisque, comme nous l'avons mentionné dans l'état de l'art, les ERO peuvent endommager l'ADNmt, conduire à une déplétion de celui-ci et par voie de conséquence engendrer un dysfonctionnement de la CRM. Nous n'avons cependant pas pu tester cette hypothèse en raison de notre support biologique (DBS) qui ne le permettait pas. La production d'ERO peut toutefois être facilement observable *in vitro* par l'utilisation de la sonde DCFH-DA (2'-7' dichlorodihydrofluorescein diacetate), qui après sa désacétylation par les estérases cellulaires, va être oxydée par les ERO et émettre un signal fluorescent vert. Nous proposons ainsi un protocole expérimental en première approche sur une lignée cellulaire hépatique, les deux ARV pouvant avoir des effets hépatotoxiques, afin de tester indépendamment la capacité du 3TC, du LPV, du RTV et du LPV/r à induire cette production et analyser en parallèle les paramètres de l'ADNmt. Le choix des concentrations à adopter devra reposer sur les concentrations plasmatiques maximales de ces ARV observées dans le plasma des CHEU au cours de l'essai PROMISE PEP afin de déterminer la concentration maximale à utiliser *in vitro*⁵²⁴. Cette approche pourrait également être couplée à une analyse de la variation du potentiel de la membrane mitochondriale par l'utilisation de la sonde cationique JC-1 (5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide). Dans les mitochondries fonctionnelles, celle-ci s'accumule sous forme d'agrégats émanant une fluorescence rouge. En revanche, toute diminution du potentiel de membrane conduit à une faible accumulation de JC-1 qui reste alors sous forme de monomères fluorescents verts. La réduction du ratio rouge/vert est ainsi indicatrice d'une dépolarisation de la membrane. A noter, l'observation de la dynamique mitochondriale à l'aide de ces deux marqueurs d'activité est extemporanée. Ces expériences *in vitro* ont été initiées au cours de cette thèse mais n'ont malheureusement pas pu être finalisées. Une autre hypothèse quant à la génotoxicité du LPV/r implique plusieurs excipients inclus dans la formulation de cet ARV, notamment l'éthanol (42.4% v/v) et le propylène glycol (15.3% m/v).

L'éthanol est connu pour stimuler la production d'ERO et altérer les défenses antioxydantes, menant ainsi à une augmentation du stress oxydatif et à une déplétion et dommages de l'ADNmt⁵²⁵. La toxicité du propylène glycol sur les mitochondries n'est quant à elle pas décrite dans la littérature et mériterait d'être investiguée *in vitro*. L'administration conjointe de ces deux excipients peut cependant entraîner l'accumulation de propylène glycol non métabolisé chez les nouveau-nés, l'éthanol entrant en compétition pour sa métabolisation⁵²⁶. La toxicité associée à un surdosage du propylène glycol inclut entre autres tachycardie, convulsion et acidose lactique, ce dernier étant bien connu pour résulter d'une dysfonction mitochondriale.

A noter, l'absence d'association entre le LPV/r et le raccourcissement des télomères mais son association avec la déplétion de l'ADNmt soulève la question du mécanisme d'action de cet ARV quant aux deux toxicités génomiques. Dans notre hypothèse de la production d'ERO via le LPV/r, la proximité de l'ADNmt avec la source de production de ces dernières en comparaison des chromosomes qui sont éloignés dans le noyau, expliquerait probablement ce phénomène. L'observation d'une relation inverse entre le nombre de copies d'ADNmt et la longueur des télomères que nous avons observée va également en ce sens.

2. Effet du genre

Nous avons montré que les garçons d'Afrique du Sud présentaient un risque plus important de déplétion de l'ADNmt comparé aux filles. Cet effet du genre sur le nombre de copies n'a jamais été observé dans les études portant sur les CHEU. Toutefois la prédominance du genre masculin dans les cas de dysfonctions mitochondriales a été rapportée par le groupe de Brogly et al. dans la cohorte PACTG 219C avec une prévalence de 75% parmi les garçons sur les 20 cas pathologiques identifiés³⁴⁷, mais également par le groupe de Blanche et al. dans la cohorte de l'Enquête Périnatale Française (EPF) (d'après communication personnelle de ³⁴⁷). Par ailleurs, cette prédominance du genre masculin a également été décrite dans les maladies mitochondriales pédiatriques affectant la population générale⁵²⁷. De façon intéressante, des études *in vivo* chez les rongeurs ont mis en évidence une production plus importante d'ERO chez les mâles que chez les femelles dans le foie et les muscles squelettiques ainsi qu'une meilleure défense antioxydante chez ces dernières, attribuables aux œstrogènes⁵²⁸. Nous pouvons supposer que dans notre étude, les garçons seraient plus vulnérables que les filles aux effets délétères des ERO sur l'ADNmt. L'implication des œstrogènes dans ce processus reste cependant discutable chez des nouveau-nés de sexe féminin.

Cet effet du genre n'a curieusement pas été observé lors de l'analyse portant sur la longueur des télomères. Il est pourtant admis dans la littérature que les femmes possèdent des télomères plus longs que les hommes, leur conférant une espérance de vie plus importante^{449,450}. A ce jour, une seule étude a montré une association positive entre le genre féminin et la longueur des télomères chez des CHEU canadiens d'origines multiples (indigènes, asiatiques, populations blanches, populations noires)⁴⁹⁸, suggérant l'implication de ces dernières dans la modulation de l'effet du genre.

3. Effet du site

Nos deux études de toxicités génomiques se rejoignent quant à l'observation d'un effet du pays d'origine sur les paramètres génomiques mesurés. Le nombre de copies d'ADNmt et la longueur des télomères étaient en effet environ deux fois plus faible parmi les CHEU d'Afrique du Sud en comparaison de ceux du Burkina Faso et de l'Ouganda. La prévalence de déplétion de l'ADNmt à W50 était également plus forte parmi les CHEU sud-africains (63.3% versus 30.2% et 35.4% pour le Burkina Faso et l'Ouganda, respectivement).

Nous avons en premier abord écarté l'hypothèse, légitime, d'une éventuelle dégradation de nos échantillons biologiques en relation avec une mauvaise conservation de ces derniers. Cet aspect était un point critique concernant l'évaluation de la toxicité mitochondriale. L'ADNn se dégradant plus vite que l'ADNmt, toute dégradation entraînerait de ce fait une augmentation du ratio nombre de copies d'ADNmt/nombre de copies d'ADNn, expliquant ainsi les valeurs absolues plus élevées au Burkina Faso et en Ouganda qu'en Afrique du Sud. Néanmoins, les quatre sites de l'essai ont suivi les mêmes procédures opératoires standardisées, notamment en matière de collection et de stockage des DBS. Par ailleurs, nous avons appliqué les mêmes procédures expérimentales en terme d'extraction ADN, de qPCR et de contrôle qualité des échantillons.

Cette différence entre pays n'a jamais été rapportée dans les études sur les CHEU pour la simple raison qu'aucune d'entre elles n'a été menée sur plusieurs pays à la fois. La majorité des études évaluant la génotoxicité des ARV chez les CHEU incluait principalement des enfants nés aux Etats-Unis^{333,334,337-339,343}, au Canada^{341,342,345,491,498,529} ou en Espagne^{335,336,530}. Seules trois études ont été conduites en Afrique : au Cameroun³⁴⁰, en Tanzanie³⁴⁴ et en Afrique du Sud⁴⁹⁹. Cette diversité dans le pays de naissance et dans l'origine des populations ainsi que l'absence d'homogénéité des techniques de quantification rend difficile la confrontation de nos résultats avec les études menées par nos pairs.

Quelques études semblent néanmoins suggérer que l'origine des populations ainsi que leur localisation spatiale au sein d'un même pays pourraient jouer un rôle. Le groupe de Brogly et al. a ainsi montré une prévalence plus importante du nombre de cas possibles de pathologies mitochondriales chez les populations noires de CHEU (63.2%) que chez les populations blanches (15.8%) et hispaniques (21.1%)⁵³¹. Le groupe canadien de Côté et al. a quant à lui rapporté un nombre de copies d'ADNmt moins important chez les CHEU nés à Vancouver par rapport à ceux nés à Toronto dans la cohorte CARMA³⁴². Les auteurs ont cependant suggéré un lien possible avec l'arrêt précoce de la prophylaxie AZT sur le site Vancouver.

La différence entre les pays n'était pas attribuable à la prophylaxie ARV maternelle donnée pendant la grossesse (AZT au Burkina Faso et en Afrique du Sud et AZT+3TC majoritairement en Ouganda). Une des explications possibles que nous proposons réside dans le sous-type du groupe M du VIH-1 circulant dans chacun des pays : souche recombinante CRF_02AG au Burkina Faso⁵³², sous-types A et D majoritaires en Ouganda⁵³³ et sous-type C en Afrique du Sud⁵³⁴. Ce dernier pourrait ainsi s'avérer être plus virulent que les deux autres sur l'ADNmt. Une approche expérimentale pourrait être conduite par l'analyse des paramètres mitochondriaux et par la production d'ERO après traitement par des protéines virales (Tat, gp120, Vpr) de différents sous-types.

4. Implication des altérations génomiques dans la santé des enfants exposés non infectés

4.1. Déplétion et délétion de l'ADNmt

La déplétion de l'ADNmt au cours de la première année de vie ainsi que la forte prévalence (>99%) de CHEU présentant une délétion de l'ADNmt aussi bien à D7 qu'à la fin de l'exposition à la prophylaxie (W50) questionnent sur le devenir de la santé des CHEU sur le long terme. A la fin de l'exposition à la prophylaxie ARV, aucun des enfants ne présentait de signes cliniques de pathologies mitochondriales même si le diagnostic de telles pathologies nécessite des investigations métaboliques, biochimiques, histo-pathologiques et requiert parfois l'utilisation d'imageries par résonance magnétiques (IRM) cérébrales. Nous n'avons pas pu analyser si la déplétion de l'ADNmt était associée à une hyperlactatémie, proxy de toute dysfonction mitochondriale, le dosage des lactates n'ayant pas été effectué dans l'essai PROMISE PEP. Nous support biologique ne permettait également pas de mesurer l'activité des complexes enzymatiques de CRM, ni d'apprécier la morphologie et le nombre des mitochondries.

Si la délétion de l'ADNmt peut sembler alarmante au premier abord, ce constat reste toutefois à nuancer. En effet, bien que les délétions de l'ADNmt ne puissent pas être réparées et que ce type de mutation soit connu pour s'accumuler avec l'âge³⁴⁸, leurs traductions en signes cliniques spécifiques restent le plus souvent rares en raison d'un faible taux d'hétéroplasmie mitochondrial (coexistence de copies d'ADNmt sauvages et mutées). En ce sens, les CHEU que nous avons analysés ne présentaient aucun signe clinique de cytopathies mitochondriales, comme ci-dessus mentionné. A ce jour, deux études se sont brièvement intéressées à la délétion de l'ADNmt des CHEU sans déceler leur présence dans les PBMC d'enfants de 18 mois exposés *in utero* et en postnatal aux INTI³⁴⁷, ou dans les cellules du cordon ombilical³⁴⁴. Les approches techniques n'étaient cependant pas les plus appropriées pour conclure de façon définitive. La forte prévalence de CHEU présentant une délétion de l'ADNmt à D7 dans notre étude reste néanmoins inquiétante et interroge. Elle soulève également la question de l'évolution de ces délétions suite à l'ajout d'une prophylaxie ARV, à la fois sur le court et sur le long terme. Si la double exposition de ces enfants au VIH et à la prophylaxie ARV maternelle pendant la grossesse ne permet pas de conclure quant à la contribution de chacun dans l'instauration précoce de cette instabilité génomique, il semblerait tout de même que le virus lui-même et/ou les protéines libres y jouent un rôle primordial, en témoigne la prévalence d'enfants porteurs d'ADNmt délétés de 86.8% chez les CHEU d'Afrique du Sud âgés de 6 semaines qui n'ont jamais été exposés aux ARV (CHEU issus programme SAPMTCT). Il est évident que ces observations requièrent davantage d'investigations. En ce sens, des analyses sont actuellement en cours, avec la collaboration du Département de Biochimie et de Génétique du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, afin de dresser un profil exhaustif des mutations, incluant les délétions, chez les CHEU de l'essai PROMISE PEP et PROMISE M&S grâce à la technologie eKLIPse développée par leur laboratoire et combinant une approche de séquençage de nouvelle génération à un algorithme d'analyse de séquence⁵³⁵. Les résultats préliminaires portent en première approche sur 32 CHEU à D7 et confirment ceux rapportés dans ces travaux de thèse avec une prévalence de 75% (24/32) de CHEU présentant des molécules d'ADNmt délétées à D7 (délétions simples et multiples), avec un taux d'hétéroplasmie variant de 0.01% à 84%. Parmi ces enfants, 91% étaient porteurs de larges délétions (supérieures à 6000 paires de bases).

Finalement, la déplétion de l'ADNmt au cours de la première année de vie n'a pas entraîné un retard de croissance ou du développement neuro-psychomoteur des enfants à 6 ans. La suspicion d'une éventuelle pathologie mitochondriale n'a par ailleurs été évoquée pour aucun des CHEU. Deux cas de cécité ont cependant été rapportés, un au Burkina Faso et un en Zambie, sans pouvoir établir avec certitude une origine mitochondriale puisque aucune investigation clinique n'a été réalisée lors de la visite de suivi. L'utilisation de l'éthambutol chez l'enfant zambien dans le cadre de son traitement pour la tuberculose pourrait cependant en être à l'origine (effet indésirable rare). Si la santé des CHEU se veut ainsi plutôt rassurante à 6 ans, il ne faut toutefois pas oublier que l'apparition des pathologies mitochondriales est généralement progressive et peut prendre plusieurs dizaines d'années. Il n'est ainsi pas exclu que les altérations de l'ADNmt que nous avons observées n'aient pas de répercussions à plus long terme chez ces enfants. Seul le suivi de ces CHEU à l'adolescence et à l'âge adulte permettrait d'apporter de telles précisions.

4.2. Raccourcissement de la longueur des télomères

Bien que la longueur des télomères ne variait pas dans son ensemble au cours de la première année de vie, nous avons identifié des CHEU qui présentaient leur raccourcissement, avec une prévalence de 44.3%. Si cette attrition télomérique constitue un processus physiologique bien connu, en particulier pendant l'enfance, elle peut néanmoins être associée à des anomalies cytogénétiques. Rappelons que les télomères jouent un rôle crucial dans le maintien de la stabilité génomique en empêchant la fusion des chromosomes entre eux^{362,363}. N'assurant plus cette fonction, les télomères raccourcis peuvent donner lieu à la formation d'un pont entre les deux chromatides sœurs lors de la mitose, empêchant ainsi la ségrégation normale des chromosomes entre les deux cellules filles et donnant naissance à la formation de micronoyaux. De façon intéressante, une étude menée chez le modèle primate *Erythrocebus Patas* a observé une augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les cellules mésenchymateuses des nouveau-nés exposés *in utero* à la combinaison AZT/3TC, avec une persistance de ces anomalies cytogénétiques à l'âge de 3 ans⁵³⁶. Chez les CHEU, une étude a rapporté une augmentation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les érythrocytes de CHEU exposés *in utero* et en postnatal à l'AZT. Cette analyse étant impossible à réaliser sur DBS, nous avons néanmoins mis au point un protocole de marquage des micronoyaux à partir de cellules en culture. Nos expériences prévoyaient de générer une population de fibroblastes à partir de bulbes capillaires prélevés sur les CHEU de Zambie. Nous ne disposions toutefois que de prélèvements à 6 ans.

5. Limitations de nos travaux

Si les travaux de cette thèse bénéficient des avantages de l'essai PROMISE PEP (essai randomisé contrôlé, choix judicieux des prophylaxies ARV, monitoring optimal de l'observance des prophylaxies, base de données exhaustive), ils présentent néanmoins quelques limites qui sont abordées ci-dessous.

L'interprétation des résultats des études menées chez les CHEU est dans son ensemble rendue difficile par la double exposition de ces enfants (pour la plupart d'entre eux) à la fois au VIH et aux ARV, et aussi bien *in utero* que pendant l'allaitement. Des variations intrinsèques à ces expositions viennent complexifier l'analyse des données. Pendant la grossesse et pendant l'allaitement, ces enfants ont en effet été exposés à des durées d'exposition variables au VIH et aux ARV, à différents régimes de TAR maternels (monothérapies, bithérapies ou multi-thérapies et switch de régime ARV), à différents types d'ARV des TAR maternels mais également à leur propre prophylaxie dont la durée et le type de molécule ARV étaient eux aussi variables. Viennent s'ajouter à ces expositions des différences socio-économiques et des modes d'alimentation différents (allaitement versus nourriture solide). Le choix d'un groupe contrôle adéquate d'enfants prenant en considération toutes ces variations est primordial mais reste difficilement solvable, en particulier lorsque le nombre d'études est limité dans une population donnée. Dans ce contexte, la principale limitation de ces travaux de thèse résidait dans l'absence d'un groupe contrôle de CHEU n'ayant pas reçu de prophylaxie ARV dans l'essai PROMISE PEP. Nous ne pouvons ainsi pas conclure quant à l'impact de la prophylaxie chez ces enfants, que ce soit sur l'ADNmt ou sur la longueur des télomères. Nous nous sommes efforcés de nous rapprocher au mieux des caractéristiques de notre cohorte, notamment en terme de recommandation de PTME, et avons pu bénéficier de DBS provenant de CHEU sud-africains n'ayant été exposés à aucun ARV. Nous ne pouvons ainsi pas extrapoler quant à l'effet de la prophylaxie au Burkina Faso et en Ouganda. La base de données de ce groupe contrôle était également limitée. Nous n'avons par exemple pas eu accès au nombre de CD4 ou à la charge virale de la mère pendant la grossesse.

Deuxièmement, nous n'avons malheureusement pas pu suivre les CHEU d'Afrique du Sud sur le long terme, les échantillons n'ayant pas été collectés dans PROMISE M&S. Il aurait été en particulier intéressant de décrire la cinétique de l'ADNmt chez ces enfants, rappelons-le les plus touchés par la déplétion de l'ADNmt, et de connaître l'impact de celle-ci sur leur santé à 6 ans.

Nous n'avons également pas pu analyser la toxicité mitochondriale des CHEU de Zambie en raison d'une corrélation entre le nombre de copies d'ADNmt et le nombre de plaquettes à D7. Nous n'avons pas pu exclure les enfants présentant cette corrélation car nous avons observé une interaction entre le site et la prophylaxie sur la déplétion de l'ADNmt.

Autre aspect, l'absence de point intermédiaire entre un an et 6 ans ne nous permet pas d'affiner nos observations, à savoir préciser à partir de quel moment le nombre de copies d'ADNmt entame son augmentation et la longueur des télomères sa diminution. Nous ne pouvons également pas avoir un aperçu intermédiaire de la santé des enfants qui pourrait se trouver transitoirement affectée.

Enfin, plusieurs données constituant des facteurs de risque potentiels d'altération génomique ont été auto-déclarées par les mères : consommation de cigarettes pendant la grossesse et l'allaitement, et consommation d'alcool pendant la grossesse. Ces informations n'ont pas pu être intégrées aux analyses portant sur la toxicité mitochondriale aiguë car elles n'étaient incluses dans les questionnaires (CRF, *case report form*) dédiés à l'essai PROMISE PEP, mais l'étaient toutefois dans ceux de PROMISE M&S. La consommation de drogues d'addiction au cours de ces deux périodes n'a quant à elle pas été collectée. Il est néanmoins peu probable que la prévalence associée à cette consommation soit importante comparativement aux populations à fortes ressources dont l'accès y est favorisé. D'autres données pouvant en particulier être associées au raccourcissement des télomères n'ont également pas été collectées : âge du père à la conception^{537,538} et infection à Cytomégalo virus⁴⁵⁵.

6. Implication de nos travaux en Santé publique

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans une évaluation globale des effets secondaires liés à l'utilisation du 3TC et du LPV/r en prophylaxie prolongée pendant un an d'allaitement lors de l'essai PROMISE PEP. Nous l'avons décrit dans l'état de l'art, l'efficacité des stratégies actuelles de PTME du VIH ne sont clairement pas suffisantes pour mettre fin à la transmission du virus par l'allaitement. Les raisons sont multiples et sont souvent liées à la mise en pratique des recommandations. Bien que l'incidence de l'infection à VIH chez les enfants de moins de 15 ans ait considérablement diminuée au cours de ces dernières décennies, elle montre cependant un ralentissement depuis ces cinq dernières années (**Figure 1.2**).

Un besoin urgent de stratégies additionnelles telles que l'utilisation d'une prophylaxie ARV infantile étendue à toute la durée de l'allaitement ne pourraient que potentialiser les schémas interventionnels actuels, qui incluent une prophylaxie plafonnée à 12 semaines pour les enfants allaités à risque d'acquisition du VIH⁵³⁹. Face à cette évidence, certaines recommandations nationales adoptent désormais une prophylaxie alternative permettant aux CHEU d'être protégés plus longtemps. C'est notamment le cas de l'Afrique du Sud qui, depuis octobre 2019, recommande l'utilisation conjointe de l'AZT pendant 6 semaines et de la NVP pendant 12 semaines chez les nouveau-nés à risque dont les mères ont une charge virale contrôlée (inférieure à 1000 copies/mL), avec la possibilité d'étendre l'utilisation de la NVP jusqu'à ce que la mère ait une charge virale contrôlée ou jusqu'à 4 semaines après la fin de l'allaitement⁵⁴⁰. La Zambie emploie elle aussi une prophylaxie alliant la combinaison AZT/3TC à la NVP pendant 12 semaines avec une extension de cette dernière selon les mêmes modalités que l'Afrique du Sud⁵⁴¹. Les questions du ou des ARV à utiliser dans un tel contexte ainsi que leurs effets sur le long terme demeurent et reposent entre autre sur l'équilibre entre la balance bénéfique/risque et sur l'accessibilité des traitements. Les deux exemples que nous avons mentionnés ci-dessus ont recours à la NVP. Si une récente étude a montré que l'administration prolongée de celle-ci pendant 6 mois n'avait pas d'impact sur la croissance des enfants (indicateurs WAZ, HAZ, BMIZ) en comparaison au schéma classique de 6 semaines⁵⁴², aucune étude n'a évalué à ce jour son effet sur une période plus longue. L'OMS recommande d'ailleurs la poursuite de l'allaitement jusqu'à 24 mois minimum et plus¹¹⁷. La NVP présente une barrière génétique faible favorisant l'apparition de mutations de résistance, questionnant sur la légitimité de son emploi sur le long-terme en tant que prophylaxie. Cet aspect reste toutefois restreint aux infections acquises en dépit de la prophylaxie. Les IP constitueraient de meilleurs candidats en raison de leur barrière génétique élevée limitant ainsi la sélection de souches VIH résistantes. En ce sens, les essais PROMISE PEP et PROMISE M&S ont apporté une évaluation globale de la toxicité du LPV/r sur le long terme, unique dans la littérature scientifique. Toutefois, l'observation d'une déplétion de l'ADNmt à un an, bien que transitoire, couplée à de précédents effets secondaires rapportés par notre unité de recherche au cours de la première année de vie indiquent que le LPV/r ne constituerait pas un ARV de choix pour son utilisation en prophylaxie prolongée. Les CHEU ayant reçu cet ARV présentaient en effet un retard de croissance caractérisé par une prise de poids légèrement plus faible à un an⁵⁴³, ainsi qu'un taux plus important des hormones surrénaliennes (hormones DHEA et 17-OH) six semaines après la naissance pour les CHEU du Burkina Faso et d'Afrique du Sud, sans signe clinique de dysfonctionnement rénal à un an⁵⁴⁴, en comparaison au 3TC.

Le retard de croissance ne persistait toutefois plus à l'âge de 6 ans (Nagot et al, Scientific reports, en soumission) et aucune différence n'a été observée entre les deux régimes prophylactiques quant au développement neuro-psychomoteur de ces enfants à 6 ans (Nagot et al, scientific reports, en soumission). Plus récemment, l'évaluation de la santé bucco-dentaire des CHEU d'Ouganda âgés de 5-7 ans se veut toutefois rassurante, sans différence entre les deux ARV bien que le LPV/r semblerait moins affecter celle-ci⁵³⁹. Le 3TC représenterait ainsi une alternative à la NVP et au LPV/r.

D'autres stratégies au profil plus innocuitaire pourraient cependant être utilisées dans les pays à forte incidence du VIH comme par exemple l'administration de bNAbs aux enfants allaités (**Figure 2.1.**), bNAbs qui ne devraient pas avoir d'effets indésirables sur les mitochondries.

Enfin, bien que ces deux prophylaxies ne fassent pas parties des programmes actuels de PTME, nos travaux sont également d'intérêt pour d'autres populations recevant ces ARV. Depuis 10 ans, le LPV/r intègre en effet la trithérapie ARV de première intention des enfants infectés par le VIH, d'abord chez les enfants de moins de 2 ans ayant été exposés à la NVP en tant que prophylaxie infantile ou à d'autres INNTI maternels inclus dans le cadre de la PTME entre 2010 et 2013⁵⁴⁵; puis à partir de 2013, étendu à tous les enfants infectés de moins de 3 ans⁵⁴⁶. Le 3TC est quant à lui inclus dans le cadre de la trithérapie ARV de première ligne des patients co-infectés VIH/Hépatite B dès l'âge de 3 ans⁵⁴⁷.

Conclusion

Les 1 000 premiers jours de la vie sont cruciaux pour le développement de l'enfant et pour la trajectoire de sa santé à l'âge adulte. Avec la généralisation de l'accès aux ARV, la plupart des CHEU sont désormais exposés aux ARV maternels dès la conception. La santé plus fragile de ces enfants rend indispensable et primordial leur suivi prolongé pour évaluer les effets indésirables à long terme des ARV pour au final garantir leur meilleure santé future. Les travaux de cette thèse vont en ce sens. Si le LPV/r et le 3TC ne semblent pas avoir d'impact sur la longueur des télomères, la toxicité mitochondriale observée avant même l'initiation de la prophylaxie et à la fin de l'exposition à l'un ou l'autre des deux régimes prophylactiques questionne sur leur impact à long terme, et ceci bien au-delà de notre suivi à 6 ans.

La question du vieillissement prématuré des CHEU demeure elle aussi, et nécessite d'être étudiée sur le long terme, en intégrant les deux versants génotoxiques, celui propre aux mitochondries et celui propre aux télomères. L'évaluation de ces paramètres génomiques, relativement facile à mettre œuvre dans son ensemble, pourrait, si ce n'est devrait, être intégrée en routine au suivi à la fois sur le court et sur le long terme de ces enfants. Celui-ci ne pourra toutefois se faire sans la disponibilité de données standardisées de référence spécifiques à chaque population étudiée, en particulier à celle d'Afrique Sub-Saharienne.

Malgré leur efficacité incontestable, les programmes de PTME se heurtent aujourd'hui à un ralentissement de la diminution de l'incidence pédiatrique à VIH. Près de la moitié des nouvelles infections étaient encore attribuables à l'allaitement en 2019 parmi les 21 pays prioritaires définis par le Plan Mondial. L'optimisation des stratégies préventives préexistantes comme la prophylaxie infantile, et/ou le développement de nouvelles interventions sont nécessaires et urgents, mais en s'accompagnant d'un minimum d'effets indésirables dans cette population qui ne cesse de croître.

Bibliographie

1. AIDSinfo | UNAIDS [Internet]. Available from: <https://aidsinfo.unaids.org/>
2. ONUSIDA. Juillet 2020 Diapositives clés sur les données épidémiologiques [Internet]. 2020. Available from: <https://www.unaids.org/fr/resources/documents/2020/core-epidemiology-slides>
3. Ziegler JB, Cooper DA, Johnson RO, Gold J. Postnatal transmission of AIDS-associated retrovirus from mother to infant. *Lancet* (London, England). 1985;1(8434):896–8.
4. Black RF. Transmission of HIV-1 in the breast-feeding process. *J Am Diet Assoc*. 1996;96(3):267–76.
5. Hira SK, Mangrola UG, Mwale C, Chintu C, Tembo G, Brady WE, et al. Apparent vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 by breast-feeding in Zambia. *J Pediatr*. 1990;117(3):421–4.
6. Van de Perre P, Simonon A, Msellati P, Hitimana DG, Vaira D, Bazubagira A, et al. Postnatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. A prospective cohort study in Kigali, Rwanda. *N Engl J Med*. 1991;325(9):593–8.
7. Van de Perre P, Hitimana DG, Simonon A, Dabis F, Msellati P, Karita P, et al. Postnatal transmission of HIV-1 associated with breast abscess. *Lancet* (London, England). 1992;339(8807):1490–1.
8. Lewis SH, Fox HE, Lewis SH, Lewis SH, Reynolds-Kohler C, Nelson JA. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet*. 1990;335(8689):565–8.
9. Ehrnst A, Lindgren S, Dictor M, Johansson B, Sönnnerborg A, Czajkowski J, et al. HIV in pregnant women and their offspring: evidence for late transmission. *Lancet* (London, England). 1991;338(8761):203–7.
10. Rouzioux C, Costagliola D, Burgard M, Blanche S, Mayaux MJ, Griscelli C, et al. Timing of mother-to-child HIV-1 transmission depends on maternal status. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *AIDS*. 1993;7 Suppl 2:S49-52.
11. Brossard Y, Aubin JT, Mandelbrot L, Bignozzi C, Brand D, Chaput A, et al. Frequency of early in utero HIV-1 infection: a blind DNA polymerase chain reaction study on 100 fetal thymuses. *AIDS*. 1995;9(4):359–66.
12. Rouzioux C, Costagliola D, Burgard M, Blanche S, Mayaux MJ, Griscelli C, et al. Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *Am J Epidemiol*. 1995;142(12):1330–7.
13. Mandelbrot L, Burgard M, Teglas JP, Bénifla JL, Khan C, Blot P, et al. Frequent detection of HIV-1 in the gastric aspirates of neonates born to HIV-infected mothers. *AIDS*. 1999;13(15):2143–9.
14. De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, Hoff E, et al. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA*. 2000;283(9):1175–82.
15. Kourtis AP, Bulterys M, Nesheim SR, Lee FK. Understanding the timing of HIV transmission from mother to infant. *JAMA*. 2001;285(6):709–12.
16. Van de Perre P, Rubbo P-A, Viljoen J, Nagot N, Tylleskär T, Lepage P, et al. HIV-1 reservoirs in breast milk and challenges to elimination of breast-feeding transmission of HIV-1. *Sci Transl Med*. 2012;4(143):143sr3.
17. Thiry L, Sprecher-Goldberger S, Jonckheer T, Levy J, Van de Perre P, Henrivaux P, et al. Isolation of AIDS virus from cell-free breast milk of three healthy virus carriers. *Lancet* (London, England). 1985;2(8460):891–2.
18. Lewis P, Nduati R, Kreiss JK, John GC, Richardson BA, Mbori-Ngacha D, et al. Cell-free human immunodeficiency virus type 1 in breast milk. *J Infect Dis*. 1998;177(1):34–9.
19. Pillay K, Coutoudis A, York D, Kuhn L, Coovadia HM. Cell-free virus in breast milk of HIV-1-seropositive women. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;24(4):330–6.

20. Rousseau CM, Nduati RW, Richardson BA, John-Stewart GC, Mbori-Ngacha DA, Kreiss JK, et al. Association of levels of HIV-1-infected breast milk cells and risk of mother-to-child transmission. *J Infect Dis.* 2004;190(10):1880–8.
21. Buranasin P, Kunakorn M, Petchelai B, Raksakait K, Wichukchinda N, Jirapinyo M, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in breast milk and colostrum of seropositive mothers. *J Med Assoc Thai.* 1993;76(1):41–5.
22. Van de Perre P, Simonon A, Hitimana DG, Dabis F, Msellati P, Mukamabano B, et al. Infective and anti-infective properties of breastmilk from HIV-1-infected women. *Lancet (London, England).* 1993;341(8850):914–8.
23. Ruff AJ, Coberly J, Halsey NA, Boulos R, Desormeaux J, Burnley A, et al. Prevalence of HIV-1 DNA and p24 antigen in breast milk and correlation with maternal factors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994;7(1):68–73.
24. Neveu D, Viljoen J, Bland RM, Nagot N, Danaviah S, Coutoudis A, et al. Cumulative Exposure to Cell-Free HIV in Breast Milk, Rather Than Feeding Pattern per se, Identifies Postnatally Infected Infants. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2011 Apr 19;52(6):819–25.
25. Henrick BM, Yao X-D, Nasser L, Roozrogousheh A, Rosenthal KL. Breastfeeding Behaviors and the Innate Immune System of Human Milk: Working Together to Protect Infants against Inflammation, HIV-1, and Other Infections. *Front Immunol.* 2017 Apr 29;8.
26. Dunn DT, Newell ML, Ades AE, Peckham CS. Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. *Lancet (London, England).* 1992;340(8819):585–8.
27. Miotti PG, Taha TE, Kumwenda NI, Broadhead R, Mtimavalye LA, Van der Hoeven L, et al. HIV transmission through breastfeeding: a study in Malawi. *JAMA.* 1999;282(8):744–9.
28. Nduati R, John G, Mbori-Ngacha D, Richardson B, Overbaugh J, Mwatha A, et al. Effect of breastfeeding and formula feeding on transmission of HIV-1: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2000;283(9):1167–74.
29. Rollins N, Mahy M, Becquet R, Kuhn L, Creek T, Mofenson L. Estimates of peripartum and postnatal mother-to-child transmission probabilities of HIV for use in Spectrum and other population-based models. *Sex Transm Infect.* 2012 May 3;88(Suppl_2):i44–51.
30. Moses SE, Tosswill J, Sudhanva M, Poulton M, Zuckerman M. HIV-1 seroconversion during pregnancy resulting in vertical transmission. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2008;41(2):152–3.
31. Johnson LF, Stinson K, Newell M-L, Bland RM, Moultrie H, Davies M-A, et al. The contribution of maternal HIV seroconversion during late pregnancy and breastfeeding to mother-to-child transmission of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012;59(4):417–25.
32. Dinh T-H, Delaney KP, Goga A, Jackson D, Lombard C, Woldesenbet S, et al. Impact of Maternal HIV Seroconversion during Pregnancy on Early Mother to Child Transmission of HIV (MTCT) Measured at 4-8 Weeks Postpartum in South Africa 2011-2012: A National Population-Based Evaluation. *PLoS One.* 2015;10(5):e0125525.
33. Birkhead GS, Pulver WP, Warren BL, Hackel S, Rodríguez D, Smith L. Acquiring human immunodeficiency virus during pregnancy and mother-to-child transmission in New York: 2002-2006. *Obstet Gynecol.* 2010;115(6):1247–55.
34. Galli L, Puliti D, Chiappini E, Gabiano C, Ferraris G, Mignone F, et al. Is the interruption of antiretroviral treatment during pregnancy an additional major risk factor for mother-to-child transmission of HIV type 1? *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2009;48(9):1310–7.
35. Dickover RE, Garratty EM, Herman SA, Sim MS, Plaeger S, Boyer PJ, et al. Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission. Effect of maternal zidovudine treatment on viral load. *JAMA.* 1996;275(8):599–605.
36. Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, Todd JA, Herman SA, McSherry GD, et al. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med.* 1996;335(22):1621–9.

37. Myer L, Phillips TK, McIntyre JA, Hsiao N-Y, Petro G, Zerbe A, et al. HIV viraemia and mother-to-child transmission risk after antiretroviral therapy initiation in pregnancy in Cape Town, South Africa. *HIV Med.* 2017;18(2):80–8.
38. Ewing AC, Ellington SR, Wiener JB, Chasela CS, Tegha G, Nelson JAE, et al. Predictors of Perinatal HIV Transmission Among Women Without Prior Antiretroviral Therapy in a Resource-Limited Setting: The Breastfeeding, Antiretrovirals and Nutrition Study. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38(5):508–12.
39. Cao Y, Krogstad P, Korber BT, Koup RA, Muldoon M, Macken C, et al. Maternal HIV-1 viral load and vertical transmission of infection: the Ariel Project for the prevention of HIV transmission from mother to infant. *Nat Med.* 1997;3(5):549–52.
40. Mayaux MJ, Dussaix E, Isopet J, Rekaewicz C, Mandelbrot L, Ciraru-Vigneron N, et al. Maternal virus load during pregnancy and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French perinatal cohort studies. SEROGEST Cohort Group. *J Infect Dis.* 1997;175(1):172–5.
41. Thea DM, Steketee RW, Pliner V, Bornschlegel K, Brown T, Orloff S, et al. The effect of maternal viral load on the risk of perinatal transmission of HIV-1. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS.* 1997;11(4):437–44.
42. Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK, et al. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med.* 1999;341(6):394–402.
43. Mofenson LM, Lambert JS, Stiehm ER, Bethel J, Meyer WA, Whitehouse J, et al. Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 185 Team. *N Engl J Med.* 1999;341(6):385–93.
44. Maternal viral load and vertical transmission of HIV-1: an important factor but not the only one. The European Collaborative Study. *AIDS.* 1999;13(11):1377–85.
45. Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, Hanson IC, Pitt J, Diaz C, et al. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002;29(5):484–94.
46. Warszawski J, Tubiana R, Le Chenadec J, Blanche S, Teglas J-P, Dollfus C, et al. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort. *AIDS.* 2008;22(2):289–99.
47. Landes M, van Lettow M, Nkhoma E, Tippet Barr B, Truwah Z, Shouten E, et al. Low detectable postpartum viral load is associated with HIV transmission in Malawi's prevention of mother-to-child transmission programme. *J Int AIDS Soc.* 2019;22(6):e25290.
48. Thomas PA, Weedon J, Krasinski K, Abrams E, Shaffer N, Matheson P, et al. Maternal predictors of perinatal human immunodeficiency virus transmission. The New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* 1994;13(6):489–95.
49. Mayaux MJ, Blanche S, Rouzioux C, Le Chenadec J, Chambrin V, Firtion G, et al. Maternal factors associated with perinatal HIV-1 transmission: the French Cohort Study: 7 years of follow-up observation. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc.* 1995;8(2):188–94.
50. Landesman SH, Kalish LA, Burns DN, Minkoff H, Fox HE, Zorrilla C, et al. Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to child. The Women and Infants Transmission Study. *N Engl J Med.* 1996;334(25):1617–23.
51. Pitt J, Brambilla D, Reichelderfer P, Landay A, McIntosh K, Burns D, et al. Maternal immunologic and virologic risk factors for infant human immunodeficiency virus type 1 infection: findings from the Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis.* 1997;175(3):567–75.
52. Group IPH, Andiman W, Bryson Y, de Martino M, Fowler M, Harris D, et al. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1--a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. *N Engl J Med.* 1999;340(13):977–87.

53. Jourdain G, Mary J-Y, Coeur S Le, Ngo-Giang-Huong N, Yuthavisuthi P, Limtrakul A, et al. Risk factors for in utero or intrapartum mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Thailand. *J Infect Dis.* 2007;196(11):1629–36.
54. Hoffman RM, Black V, Technau K, van der Merwe KJ, Currier J, Coovadia A, et al. Effects of highly active antiretroviral therapy duration and regimen on risk for mother-to-child transmission of HIV in Johannesburg, South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;54(1):35–41.
55. Chibwasha CJ, Giganti MJ, Putta N, Chintu N, Mulindwa J, Dorton BJ, et al. Optimal time on HAART for prevention of mother-to-child transmission of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;58(2):224–8.
56. Townsend CL, Byrne L, Cortina-Borja M, Thorne C, de Ruiter A, Lyall H, et al. Earlier initiation of ART and further decline in mother-to-child HIV transmission rates, 2000–2011. *AIDS.* 2014;28(7):1049–57.
57. Dabis F, Bequet L, Ekouevi DK, Viho I, Rouet F, Horo A, et al. Field efficacy of zidovudine, lamivudine and single-dose nevirapine to prevent peripartum HIV transmission. *AIDS.* 2005 May 3;19(3):309–18.
58. Siegfried N, Merwe L van der, Brocklehurst P, Sint TT. Antiretrovirals for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 May 3;(7).
59. Andreasson PA, Dias F, Nauc ler A, Andersson S, Biberfeld G. A prospective study of vertical transmission of HIV-2 in Bissau, Guinea-Bissau. *AIDS.* 1993;7(7):989–93.
60. Adjorlolo-Johnson G, De Cock KM, Ekpini E, Vetter KM, Sibailly T, Brattegaard K, et al. Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *JAMA.* 1994;272(6):462–6.
61. Comparison of vertical human immunodeficiency virus type 2 and human immunodeficiency virus type 1 transmission in the French prospective cohort. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* 1994;13(6):502–6.
62. O'Donovan D, Ariyoshi K, Milligan P, Ota M, Yamuah L, Sarge-Njie R, et al. Maternal plasma viral RNA levels determine marked differences in mother-to-child transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in The Gambia. MRC/Gambia Government/University College London Medical School working group on mother-child transmission of HIV. *AIDS.* 2000;14(4):441–8.
63. P dua E, Almeida C, Nunes B, Cortes Martins H, Castela J, Neves C, et al. Assessment of mother-to-child HIV-1 and HIV-2 transmission: an AIDS reference laboratory collaborative study. *HIV Med.* 2009;10(3):182–90.
64. Burgard M, Jasseron C, Matheron S, Damond F, Hamrene K, Blanche S, et al. Mother-to-child transmission of HIV-2 infection from 1986 to 2007 in the ANRS French Perinatal Cohort EPF-CO1. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2010;51(7):833–43.
65. Adachi K, Xu J, Yeganeh N, Camarca M, Morgado MG, Watts DH, et al. Combined evaluation of sexually transmitted infections in HIV-infected pregnant women and infant HIV transmission. *PLoS One.* 2018 Apr 19;13(1).
66. Mandelbrot L, Mayaux MJ, Bongain A, Berrebi A, Moudoub-Jeanpetit Y, B nifla JL, et al. Obstetric factors and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: The French perinatal cohorts. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175(3 PART 1):661–7.
67. Mwapasa V, Rogerson SJ, Kwiek JJ, Wilson PE, Milner D, Molyneux ME, et al. Maternal syphilis infection is associated with increased risk of mother-to-child transmission of HIV in Malawi. *AIDS.* 2006;20(14):1869–77.
68. Drake AL, John-Stewart GC, Wald A, Mbori-Ngacha DA, Bosire R, Wamalwa DC, et al. Herpes simplex virus type 2 and risk of intrapartum human immunodeficiency virus transmission. *Obstet Gynecol.* 2007;109(2 Pt 1):403–9.
69. Bollen LJ, Whitehead SJ, Mock PA, Leelawiwat W, Asavapiriyant S, Chalermchockchareonkit A, et al. Maternal herpes simplex virus type 2 coinfection increases the risk of perinatal HIV transmission: possibility to further decrease transmission? *AIDS.* 2008;22(10):1169–76.

70. Cowan FM, Humphrey JH, Ntozini R, Mutasa K, Morrow R, Iliff P. Maternal Herpes simplex virus type 2 infection, syphilis and risk of intra-partum transmission of HIV-1: results of a case control study. *AIDS*. 2008;22(2):193–201.
71. Thorne C, Malyuta R, Semenenko I, Pilipenko T, Stelmah A, Posokhova S, et al. Mother-to-child transmission risk is increased among HIV-infected pregnant women in Ukraine with serological test results positive for syphilis. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008;47(8):1114–5.
72. King CC, Ellington SR, Kourtis AP. The Role of Co-Infections in Mother-to-Child Transmission of HIV. *Curr HIV Res*. 2013 Apr 19;11(1):10–23.
73. Sivarajah V, Venus K, Yudin MH, Murphy KE, Morrison SA, Tan DHS. Does maternal HSV-2 coinfection increase mother-to-child transmission of HIV? A systematic review. *Sex Transm Infect*. 2017 Apr 16;93(8):535–42.
74. Ngo-Giang-Huong N, Jourdain G, Siriungsi W, Decker L, Khamduang W, Le Cœur S, et al. Human immunodeficiency virus–hepatitis C virus co-infection in pregnant women and perinatal transmission to infants in Thailand. *Int J Infect Dis*. 2010 Apr 19;14(7):e602–7.
75. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS*. 2008;22(12):1493–501.
76. Nanche D, Lahuerta M, Bardaji A, Sigauque B, Romagosa C, Berenguera A, et al. Mother-to-child transmission of HIV-1: association with malaria prevention, anaemia and placental malaria. *HIV Med*. 2008;9(9):757–64.
77. Bulterys PL, Chao A, Dalai SC, Zink MC, Dushimimana A, Katzenstein D, et al. Placental Malaria and Mother-to-Child Transmission of Human Immunodeficiency Virus-1 in Rural Rwanda. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Apr 19;85(2):202–6.
78. Mbachu II, Ejikunle SD, Anolue F, Mbachu CN, Dike E, Ejikem E, et al. Relationship between placenta malaria and mother to child transmission of HIV infection in pregnant women in South East Nigeria. *Malar J*. 2020;19(1):97.
79. Delicio AM, Milanez H, Amaral E, Morais SS, Lajos GJ, e Silva JLCP, et al. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in aten years period. *Reprod Health*. 2011;8:35.
80. Van Dyke RB, Chadwick EG, Hazra R, Williams PL, Seage GR. The PHACS SMARTT Study: Assessment of the Safety of In Utero Exposure to Antiretroviral Drugs. *Front Immunol*. 2016;7:199.
81. Mode of delivery in HIV-infected pregnant women and prevention of mother-to-child transmission: changing practices in Western Europe. *HIV Med*. 2010 Apr 17;11(6):368–78.
82. Collaboration EM of D. Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. *Lancet (London, England)*. 1999;353(9158):1035–9.
83. Kennedy CE, Yeh PT, Pandey S, Betran AP, Narasimhan M. Elective cesarean section for women living with HIV: a systematic review of risks and benefits. *AIDS*. 2017 Apr 16;31(11):1579–91.
84. Peters H, Byrne L, De Ruiter A, Francis K, Harding K, Taylor GP, et al. Duration of ruptured membranes and mother-to-child HIV transmission: a prospective population-based surveillance study. *BJOG an Int J Obstet Gynaecol*. 2016;123(6):975–81.
85. Group IPHI V. Duration of ruptured membranes and vertical transmission of HIV-1: a meta-analysis from 15 prospective cohort studies. *AIDS*. 2001;15(3):357–68.
86. Van Dyke RB, Korber BT, Popek E, Macken C, Widmayer SM, Bardeguet A, et al. The Ariel Project: A prospective cohort study of maternal-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the era of maternal antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 1999;179(2):319–28.
87. Minkoff H, Burns DN, Landesman S, Youchah J, Goedert JJ, Nugent RP, et al. The relationship of the duration of ruptured membranes to vertical transmission of human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173(2):585–9.
88. Scavalli CPS, Mandelbrot L, Berrebi A, Batallan A, Cravello L, Pannier E, et al. Twin pregnancy as a risk factor for mother-to-child transmission of HIV-1: trends over 20 years. *AIDS*. 2007;21(8):993–1002.

89. Mouafo LCM, Dambaya B, Ngoufack NN, Nkenfou CN. Host Molecular Factors and Viral Genotypes in the Mother-to-Child HIV-1 Transmission in Sub-Saharan Africa. *J Public Health Africa*. 2017 Apr 16;8(1).
90. Ahir-Bist S, Chavan V, Samant-Mavani P, Nanavati R, Mehta P, Mania-Pramanik J. Polymorphisms in TH1-TH2 cytokine and receptor genes associated with risk of vertical HIV transmission, in Mumbai, India. *J Gene Med*. 2018;20(10–11):e3047.
91. Thorne C, Newell M-L, Study EC. Are girls more at risk of intrauterine-acquired HIV infection than boys? *AIDS*. 2004;18(2):344–7.
92. Galli L, Puliti D, Chiappini E, Gabiano C, Tovo P-A, Pezzotti P, et al. Lower mother-to-child HIV-1 transmission in boys is independent of type of delivery and antiretroviral prophylaxis: the Italian Register for HIV Infection in Children. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;40(4):479–85.
93. Taha TE, Nour S, Kumwenda NI, Broadhead RL, Fiscus SA, Kafulafula G, et al. Gender differences in perinatal HIV acquisition among African infants. *Pediatrics*. 2005;115(2):e167-172.
94. Semba RD, Kumwenda N, Hoover DR, Taha TE, Quinn TC, Mtimavalye L, et al. Human immunodeficiency virus load in breast milk, mastitis, and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. 1999;180(1):93–8.
95. Richardson BA, John-Stewart GC, Hughes JP, Nduati R, Mbori-Ngacha D, Overbaugh J, et al. Breast-Milk Infectivity in Human Immunodeficiency Virus Type 1–Infected Mothers. *J Infect Dis*. 2003 Apr 26;187(5):736–40.
96. Shapiro RL, Smeaton L, Lockman S, Thior Ibou, Rossenkhan R, Wester C, et al. Risk Factors for Early and Late Transmission of HIV via Breast-Feeding among Infants Born to HIV-Infected Women in a Randomized Clinical Trial in Botswana. *J Infect Dis*. 2009 Apr 25;199(3):414–8.
97. Embree JE, Njenga S, Datta P, Nagelkerke NJ, Ndinya-Achola JO, Mohammed Z, et al. Risk factors for postnatal mother-child transmission of HIV-1. *AIDS*. 2000;14(16):2535–41.
98. Chang TS, Wiener J, Dollard SC, Amin MM, Ellington S, Chasela C, et al. Effect of cytomegalovirus infection on breastfeeding transmission of HIV and on the health of infants born to HIV-infected mothers. *AIDS*. 2015 Apr 23;29(7):831–6.
99. Viljoen J, Tuailon E, Nagot N, Danaviah S, Peries M, Padayachee P, et al. Cytomegalovirus, and possibly Epstein-Barr virus, shedding in breast milk is associated with HIV-1 transmission by breastfeeding. *AIDS*. 2015;29(2):145–53.
100. Coutsooudis A, Pillay K, Spooner E, Kuhn L, Coovadia HM. Influence of infant-feeding patterns on early mother-to-child transmission of HIV-1 in Durban, South Africa: a prospective cohort study. *Lancet*. 1999 Apr 25;354(9177):471–6.
101. Coutsooudis A, Pillay K, Kuhn L, Spooner E, Tsai WY, Coovadia HM, et al. Method of feeding and transmission of HIV-1 from mothers to children by 15 months of age: prospective cohort study from Durban, South Africa. *AIDS*. 2001;15(3):379–87.
102. Iliff PJ, Piwoz EG, Tavengwa N V, Zunguza CD, Marinda ET, Nathoo KJ, et al. Early exclusive breastfeeding reduces the risk of postnatal HIV-1 transmission and increases HIV-free survival. *AIDS*. 2005;19(7):699–708.
103. Kuhn L, Sinkala M, Kankasa C, Semrau K, Kasonde P, Scott N, et al. High Uptake of Exclusive Breastfeeding and Reduced Early Post-Natal HIV Transmission. *PLoS One*. 2007 Apr 25;2(12).
104. Becquet R, Ekouevi DK, Menan H, Amani-Bosse C, Bequet L, Viho I, et al. Early mixed feeding and breastfeeding beyond 6 months increase the risk of postnatal HIV transmission: ANRS 1201/1202 Ditrème Plus, Abidjan, Côte d'Ivoire. *Prev Med (Baltim)*. 2008;47(1):27–33.
105. Becquet R, Bland R, Leroy V, Rollins NC, Ekouevi DK, Coutsooudis A, et al. Duration, Pattern of Breastfeeding and Postnatal Transmission of HIV: Pooled Analysis of Individual Data from West and South African Cohorts. *PLoS One*. 2009 Apr 25;4(10).
106. de Martino M, Tovo PA, Tozzi AE, Pezzotti P, Galli L, Livadiotti S, et al. HIV-1 transmission through breast-milk: appraisal of risk according to duration of feeding. *AIDS*. 1992;6(9):991–7.

107. Datta P, Embree JE, Kreiss JK, Ndinya-Achola JO, Braddick M, Temmerman M, et al. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: report from the Nairobi Study. *J Infect Dis.* 1994;170(5):1134–40.
108. John GC, Richardson BA, Nduati RW, Mbori-Ngacha D, Kreiss JK. Timing of breast milk HIV-1 transmission: a meta-analysis. *East Afr Med J.* 2001;78(2):75–9.
109. Potty RS, Sinha A, Sethumadhavan R, Isac S, Washington R. Incidence, prevalence and associated factors of mother-to-child transmission of HIV, among children exposed to maternal HIV, in Belgaum district, Karnataka, India. *BMC Public Health.* 2019;19(1):386.
110. Harmsen MC, Swart PJ, de Béthune MP, Pauwels R, De Clercq E, The TH, et al. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J Infect Dis.* 1995;172(2):380–8.
111. Swart PJ, Kuipers ME, Smit C, Pauwels R, deBéthune MP, de Clercq E, et al. Antiviral effects of milk proteins: acylation results in polyanionic compounds with potent activity against human immunodeficiency virus types 1 and 2 in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996;12(9):769–75.
112. Semba RD, Miotti PG, Lan Y, Chiphangwi JD, Hoover DR, Dallabetta GA, et al. Maternal serum lactoferrin and vertical transmission of HIV. *AIDS.* 1998;12(3):331–2.
113. Farquhar C, VanCott TC, Mbori-Ngacha DA, Horani L, Bosire RK, Kreiss JK, et al. Salivary secretory leukocyte protease inhibitor is associated with reduced transmission of human immunodeficiency virus type 1 through breast milk. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1173–6.
114. Sachdeva N, Oshima K, Cotter A, Ashman M, Davila L, Okazaki T, et al. Analysis of immunological markers associated with pregnancy and HIV-1 infection: relevance in perinatal transmission in HIV-1-infected pregnant women with low plasma viral load. *Am J Reprod Immunol (New York, NY 1989).* 2008;60(3):264–73.
115. Pollara J, McGuire E, Fouda GG, Rountree W, Eudailey J, Overman RG, et al. Association of HIV-1 Envelope-Specific Breast Milk IgA Responses with Reduced Risk of Postnatal Mother-to-Child Transmission of HIV-1. *J Virol.* 2015;89(19):9952–61.
116. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet.* 2008 Feb 17;371(9608):243–60.
117. World Health Organization. Updates on HIV and infant feeding - The duration of breastfeeding and support from health services to improve feeding practices among mothers living with HIV. 2016.
118. World Health Organization. Global Plan towards the elimination of new HIV infections among children and keeping their mothers alive. 2011-2015. 2011.
119. UNAIDS. 2015 Progress report on the global Plan [Internet]. 2015. Available from: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2774_2015ProgressReport_GlobalPlan_en.pdf
120. UNAIDS. 90-90-90 An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic [Internet]. 2014. Available from: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_en.pdf
121. UNAIDS. Start Free Stay Free AIDS Free [Internet]. 2016. Available from: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/Stay_free_vision_mission_En.pdf
122. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O’Sullivan MJ, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med.* 1994;331(18):1173–80.
123. Morbidity and mortality weekly Report. Recommendations of the U.S. Public Health Service Task Force on the use of zidovudine to reduce perinatal transmission of human immunodeficiency virus. 1994;43(RR-11):1–20.
124. Centers for Disease Control and Prevention. Administration of zidovudine during late pregnancy and delivery to prevent perinatal HIV transmission in Thailand, 1996-1998. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1998;47(8):151–4.

125. World Health Organization. *New Data on the Prevention of Mother-to-Child Transmission of HIV and their Policy Implications*. 2000;
126. World Health Organization. *Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: guidelines on care, treatment and support for women living with HIV/AIDS and their children in resource-constrained settings*. Geneva; 2004.
127. World Health Organization. *Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: towards universal access. Recommendations for a public health approach 2006 version*. 2006;
128. World Health Organization. *Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: Recommendations for a public health approach 2010 version*. 2010;
129. World Health Organization. *Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach*. June 2013. 2013;(June).
130. World Health Organization. *Consolidated guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for treating And Preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach*. Second edition 2016. 2016;
131. Abrams EJ, Langwenya N, Gachuhi A, Zerbe A, Nuwagaba-Biribonwoha H, Mthethwa-Hleta S, et al. Impact of universal antiretroviral therapy for pregnant and postpartum women on antiretroviral therapy uptake and retention. *AIDS*. 2019 May 3;33(1):45–54.
132. Knettel BA, Cichowitz C, Ngocho JS, Knippler ET, Chumba LN, Mmbaga BT, et al. Retention in HIV Care During Pregnancy and the Postpartum Period in the Option B+ Era: Systematic Review and Meta-Analysis of Studies in Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2018;77(5):427–38.
133. Pfeiffer JT, Napúa M, Wagenaar BH, Chale F, Hoek R, Micek M, et al. Stepped-Wedge Cluster Randomized Controlled Trial to Promote Option B+ Retention in Central Mozambique. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;76(3):273–80.
134. Haas AD, Tenthani L, Msukwa MT, Tal K, Jahn A, Gadabu OJ, et al. Retention in care during the first 3 years of antiretroviral therapy for women in Malawi’s Option B+ programme: an observational cohort study. *lancet HIV*. 2016 May 3;3(4):e175–82.
135. Manigart O, Crepin M, Leroy V, Meda N, Valea D, Janoff EN, et al. Effect of perinatal zidovudine prophylaxis on the evolution of cell-free HIV-1 RNA in breast milk and on postnatal transmission. *J Infect Dis*. 2004;190(8):1422–8.
136. UNICEF. *The state of the world’s children: Statistical tables*. 2017;1–60.
137. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *Progress towards the Start Free, Stay Free, AIDS Free targets*. 2020 report. 2020.
138. World Health Organization. *HIV Country Profiles [Internet]*. Available from: <https://cfs.hivci.org/>
139. Bispo S, Chikhungu L, Rollins N, Siegfried N, Newell M-L. Postnatal HIV transmission in breastfed infants of HIV-infected women on ART: a systematic review and meta-analysis. *J Int AIDS Soc*. 2017 May 3;20(1).
140. Molès J-P, Méda N, Kankasa C, Tumwine J, Singata-Madliki M, Tassemedebo S, et al. A new plan for extended paediatric HIV testing is needed in Africa. *Lancet Glob Heal*. 2019 May 3;7(12):e1603–4.
141. Van De Perre P, Goga A, Ngandu N, Nagot N, Moodley D, King R, et al. Eliminating post-natal HIV transmission in high incidence areas: need for complementary biomedical interventions. *Lancet*. 2020;In press.
142. Dashi A, DeVico AL, Lewis GK, Sajadi MM. Broadly Neutralizing Antibodies against HIV: Back to Blood. *Trends Mol Med*. 2019 May 1;25(3):228–40.
143. Cunningham CK, McFarland EJ, Morrison RL, Capparelli E V, Safrit JT, Mofenson LM, et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of the Broadly Neutralizing HIV-1 Monoclonal Antibody VRC01 in HIV-Exposed Newborn Infants. *J Infect Dis*. 2019;

144. PrEP adherence and effect of drug level feedback among young African women in HPTN 082 | Cochrane Library. 2020.
145. Sidebottom D, Ekström AM, Strömdahl S. A systematic review of adherence to oral pre-exposure prophylaxis for HIV - how can we improve uptake and adherence? *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):581.
146. Landovitz RJ, Li S, Grinsztejn B, Dawood H, Liu AY, Magnus M, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of long-acting injectable cabotegravir in low-risk HIV-uninfected individuals: HPTN 077, a phase 2a randomized controlled trial. *PLoS Med.* 2018;15(11):e1002690.
147. Nagot N, Kankasa C, Meda N, Hofmeyr J, Nikodem C, Tumwine JK, et al. Lopinavir/Ritonavir versus Lamivudine peri-exposure prophylaxis to prevent HIV-1 transmission by breastfeeding: the PROMISE-PEP trial Protocol ANRS 12174. *BMC Infect Dis.* 2012;12:246.
148. Nagot N, Kankasa C, Tumwine JK, Meda N, Hofmeyr GJ, Vallo R, et al. Extended pre-exposure prophylaxis with lopinavir-ritonavir versus lamivudine to prevent HIV-1 transmission through breastfeeding up to 50 weeks in infants in Africa (ANRS 12174): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England).* 2016;387(10018):566–73.
149. International AIDS Society (IAS). 5th HIV-Exposed Uninfected Child and Adolescent Workshop [Internet]. 2019. Available from: <https://www.iasociety.org/HIV-Programmes/Programmes/Paediatrics-CIPHER/5th-HIV-Exposed-Uninfected-Child-and-Adolescent-Workshop>
150. Barker DJP. The fetal and infant origins of disease. Vol. 25, *European Journal of Clinical Investigation.* Eur J Clin Invest; 1995. p. 457–63.
151. Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2011;41(6):158–76.
152. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J.* 1989;299(6710):1259–60.
153. Gollwitzer ES, Marsland BJ. Impact of Early-Life Exposures on Immune Maturation and Susceptibility to Disease. Vol. 36, *Trends in Immunology.* Elsevier Ltd; 2015. p. 684–96.
154. Newell M-L, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, Dabis F, et al. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *Lancet (London, England).* 2004;364(9441):1236–43.
155. Brennan AT, Bonawitz R, Gill CJ, Thea DM, Kleinman M, Useem J, et al. A meta-analysis assessing all-cause mortality in HIV-exposed uninfected compared with HIV-unexposed uninfected infants and children. *AIDS.* 2016;30(15):2351–60.
156. Arikawa S, Rollins N, Newell M-L, Becquet R. Mortality risk and associated factors in HIV-exposed, uninfected children. *Trop Med Int Heal TM IH.* 2016;21(6):720–34.
157. Taron-Brocard C, Le Chenadec J, Faye A, Dollfus C, Goetghebuer T, Gajdos V, et al. Increased risk of serious bacterial infections due to maternal immunosuppression in HIV-exposed uninfected infants in a European country. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2014;59(9):1332–45.
158. Slogrove AL, Goetghebuer T, Cotton MF, Singer J, Bettinger JA. Pattern of infectious morbidity in HIV-exposed uninfected infants and children. Vol. 7, *Frontiers in Immunology.* Frontiers Media S.A.; 2016.
159. Powis KM, Slogrove AL, Okorafor I, Millen L, Posada R, Childs J, et al. Maternal Perinatal HIV Infection Is Associated with Increased Infectious Morbidity in HIV-exposed Uninfected Infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2019 May 1;38(5):500–2.
160. Ruck C, Reikie BA, Marchant A, Kollmann TR, Kakkar F. Linking susceptibility to infectious diseases to immune system abnormalities among HIV-exposed uninfected infants. *Front Immunol.* 2016 Aug 19;7(AUG).
161. Slogrove AL, Esser MM, Cotton MF, Speert DP, Kollmann TR, Singer J, et al. A Prospective cohort study of common childhood infections in South African HIV-exposed uninfected and HIV-unexposed infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(2).

162. Dauby N, Chamekh M, Melin P, Slogrove AL, Goetghebuer T. Increased risk of group B streptococcus invasive infection in HIV-exposed but uninfected infants: A review of the evidence and possible mechanisms. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2016.
163. Bunders M, Pembrey L, Kuijpers T, Newell ML. Evidence of impact of maternal HIV infection on immunoglobulin levels in HIV-exposed uninfected children. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26(9):967–75.
164. Afran L, Garcia Knight M, Nduati E, Urban BC, Heyderman RS, Rowland-Jones SL. HIV-exposed uninfected children: A growing population with a vulnerable immune system? *Clin Exp Immunol*. 2014;176(1):11–22.
165. Reikie, A B, Naidoo S, Rusk CE, Beer C De, Kollmann TR. Altered innate immune development in HIV-exposed uninfected infants. *JAIDS*. 2014;66(3):245–55.
166. Abu-Raya B, Kollmann TR, Marchant A, MacGillivray DM. The Immune System of HIV-Exposed Uninfected Infants. *Front Immunol*. 2016 Apr 11;7.
167. Miyamoto M, Gouvêa AFTB, Ono E, Succi RCM, Pahwa S, de Moraes-Pinto MI. Immune development in HIV-exposed uninfected children born to HIV-infected women. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017 Feb 28;59.
168. Lohman-Payne B, Gabriel B, Park S, Wamalwa D, Maleche-Obimbo E, Farquhar C, et al. HIV-exposed uninfected infants: elevated cord blood Interleukin 8 (IL-8) is significantly associated with maternal HIV infection and systemic IL-8 in a Kenyan cohort. *Clin Transl Med*. 2018 Dec;7(1):26.
169. Dirajlal-Fargo S, Mussi-Pinhata MM, Weinberg A, Yu Q, Cohen R, Harris DR, et al. HIV-exposed-uninfected infants have increased inflammation and monocyte activation. *AIDS*. 2019;33(5).
170. Sofeu CL, Warszawski J, Ndongo FA, Penda IC, Ndiang ST, Guemkam G, et al. Low birth weight in perinatally HIV-exposed uninfected infants: Observations in urban settings in Cameroon. *PLoS One*. 2014 Apr 3;9(4).
171. Rosala-Hallas A, Bartlett JW, Filteau S. Growth of HIV-exposed uninfected, compared with HIV-unexposed, Zambian children: a longitudinal analysis from infancy to school age. *BMC Pediatr*. 2017;17(1):80.
172. Omoni AO, Ntozini R, Evans C, Prendergast AJ, Moulton LH, Christian PS, et al. Child Growth According to Maternal and Child HIV Status in Zimbabwe. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(9):869–76.
173. Jumare J, Datong P, Osawe S, Okolo F, Mohammed S, Inyang B, et al. Compromised Growth among HIV-exposed Uninfected Compared with Unexposed Children in Nigeria. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(3).
174. le Roux SM, Abrams EJ, Donald KA, Brittain K, Phillips TK, Nguyen KK, et al. Growth trajectories of breastfed HIV-exposed uninfected and HIV-unexposed children under conditions of universal maternal antiretroviral therapy: a prospective study. *Lancet Child Adolesc Heal*. 2019 Apr 1;3(4):234–44.
175. Wedderburn CJ, Evans C, Yeung S, Gibb DM, Donald KA, Prendergast AJ. Growth and Neurodevelopment of HIV-Exposed Uninfected Children: a Conceptual Framework. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2019 Jan 9;16(6):501–13.
176. Sofeu CL, Tejiokem MC, Penda CI, Protopopescu C, Ndongo FA, Ndiang ST, et al. Early treated HIV-infected children remain at risk of growth retardation during the first five years of life: Results from the ANRS-PEDIACAM cohort in Cameroon. *PLoS One*. 2019;14(7).
177. Moseholm E, Helleberg M, Sandholdt H, Katzenstein TL, Storgaard M, Pedersen G, et al. Children Exposed or Unexposed to Human Immunodeficiency Virus: Weight, Height, and Body Mass Index During the First 5 Years of Life-A Danish Nationwide Cohort. *Clin Infect Dis*. 2020 May 6;70(10):2168–77.
178. Benhammou V, Warszawski J, Bellec S, Doz F, André N, Lacour B, et al. Incidence of cancer in children perinatally exposed to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS*. 2008;22(16):2165–77.
179. Hleyhel M, Goujon S, Delteil C, Vasiljevic A, Luzi S, Stephan JL, et al. Risk of cancer in children exposed to didanosine in utero. *AIDS*. 2016 May 15;30(8):1245–56.

180. Hleyhel M, Goujon S, Sibiude J, Tubiana R, Dollfus C, Faye A, et al. Risk of cancer in children exposed to antiretroviral nucleoside analogues in utero: The french experience. *Environ Mol Mutagen*. 2019 Jun 1;60(5):404–9.
181. Vannappagari V, Albano JD, Koram N, Tilson H, Scheuerle AE, Napier MD. Prenatal exposure to zidovudine and risk for ventricular septal defects and congenital heart defects: Data from the Antiretroviral Pregnancy Registry. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016 Feb 1;197:6–10.
182. Williams PL, Crain MJ, Yildirim C, Hazra R, Van Dyke RB, Rich K, et al. Congenital anomalies and in utero antiretroviral exposure in human immunodeficiency virus-exposed uninfected infants. *JAMA Pediatr*. 2015 Jan 1;169(1):48–55.
183. Lipshultz SE, Shearer WT, Thompson B, Rich KC, Cheng I, Orav EJ, et al. Cardiac effects of antiretroviral therapy in HIV-negative infants born to HIV-positive mothers: NHLBI CHAART-1 (National Heart, Lung, and Blood Institute Cardiovascular Status of HAART Therapy in HIV-Exposed Infants and Children Cohort Study). *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(1):76–85.
184. Lipshultz SE, Miller TL, Wilkinson JD, Scott GB, Somarriba G, Cochran TR, et al. Cardiac effects in perinatally HIV-infected and HIV-exposed but uninfected children and adolescents: A view from the United States of America. *J Int AIDS Soc*. 2013 Jun 18;16(1).
185. Sibiude J, Le Chenadec J, Bonnet D, Tubiana R, Faye A, Dollfus C, et al. In Utero Exposure to Zidovudine and Heart Anomalies in the ANRS French Perinatal Cohort and the Nested PRIMEVA Randomized Trial. *Clin Infect Dis*. 2015 Jul 15;61(2):270–80.
186. Lipshultz SE, Mas CM, Henkel JM, Franco VI, Fisher SD, Miller TL. HAART to Heart: Highly active antiretroviral therapy and the risk of cardiovascular disease in HIV-infected or exposed children and adults. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012 Jun;10(6):661–74.
187. Guerra V, Leister EC, Williams PL, Starc TJ, Lipshultz SE, Wilkinson JD, et al. Long-Term Effects of in Utero Antiretroviral Exposure: Systolic and Diastolic Function in HIV-Exposed Uninfected Youth. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2016;32(7):621–7.
188. Lipshultz SE, Sasaki N, Thompson B, Eidem BW, Cheng I, Colan SD, et al. Left ventricular diastolic dysfunction in HIV-uninfected infants exposed in utero to antiretroviral therapy. *AIDS*. 2020 Mar 15;34(4):529–37.
189. Simon A, Warszawski J, Kariyawasam D, Le Chenadec J, Benhammou V, Czernichow P, et al. Association of prenatal and postnatal exposure to lopinavir-ritonavir and adrenal dysfunction among uninfected infants of HIV-infected mothers. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2011 Jul 6;306(1):70–8.
190. Kariyawasam D, Peries M, Foissac F, Eymard-Duvernay S, Tylleskär T, Singata-Madliki M, et al. Lopinavir-Ritonavir Impairs Adrenal Function in Infants. *Clin Infect Dis*. 2019 Oct 21;71(4).
191. Williams PL, Hazra R, Van Dyke RB, Yildirim C, Crain MJ, Seage GR, et al. Antiretroviral exposure during pregnancy and adverse outcomes in HIV-exposed uninfected infants and children using a trigger-based design. *AIDS*. 2016;30(1):133–44.
192. Jao J, Kirmse B, Yu C, Qiu Y, Powis K, Nshom E, et al. Lower preprandial insulin and altered fuel use in HIV/antiretroviral-exposed infants in Cameroon. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Sep 1;100(9):3260–9.
193. Alimenti A, Burdge DR, Ogilvie GS, Money DM, Forbes JC. Lactic acidemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants exposed to perinatal antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 Sep 1;22(9):782–8.
194. Noguera A, Fortuny C, Muñoz-Almagro C, Sanchez E, Vilaseca MA, Artuch R, et al. Hyperlactatemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants who are exposed to antiretrovirals. *Pediatrics*. 2004 Nov;114(5).
195. Ekouevi DK, Touré R, Becquet R, Viho I, Sakarovitch C, Rouet F, et al. Serum lactate levels in infants exposed peripartum to antiretroviral agents to prevent mother-to-child transmission of HIV: Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales 1209 study, Abidjan, Ivory Coast. *Pediatrics*. 2006;118(4).

196. Crain MJ, Williams PL, Griner R, Tassiopoulos K, Read JS, Mofenson LM, et al. Point-of-care capillary blood lactate measurements in human immunodeficiency virus-uninfected children with in utero exposure to human immunodeficiency virus and antiretroviral medications. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(12):1069–74.
197. Rice ML, Zeldow B, Siberry GK, Purswani M, Malee K, Hoffman HJ, et al. Evaluation of Risk for Late Language Emergence after In Utero Antiretroviral Drug Exposure in HIV-exposed Uninfected Infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(10):1–19.
198. Ngoma MS, Hunter JA, Harper JA, Church PT, Mumba S, Chandwe M, et al. Cognitive and language outcomes in HIV-uninfected infants exposed to combined antiretroviral therapy in utero and through extended breast-feeding. *AIDS.* 2014;28 Suppl 3:S323-330.
199. Jahanshad N, Couture MC, Prasitsuebsai W, Nir TM, Aурpibul L, Thompson PM, et al. Brain Imaging and Neurodevelopment in HIV-uninfected Thai Children Born to HIV-infected Mothers. *Pediatr Infect Dis J.* 2015 Sep 26;34(9):e211–6.
200. Boivin MJ, Barlow-Mosha L, Chernoff MC, Laughton B, Zimmer B, Joyce C, et al. Neuropsychological performance in African children with HIV enrolled in a multisite antiretroviral clinical trial. *AIDS.* 2018 Jan 14;32(2):189–204.
201. Boivin MJ, Maliwichi-Senganimalunje L, Ogwang LW, Kawalazira R, Sikorskii A, Familiar-Lopez I, et al. Neurodevelopmental effects of ante-partum and post-partum antiretroviral exposure in HIV-exposed and uninfected children versus HIV-unexposed and uninfected children in Uganda and Malawi: a prospective cohort study. *Lancet HIV.* 2019 Aug 1;6(8):e518–30.
202. Gruver R, Mall S, Kvalsvig J, Knox J, Mellins C, Desmond C, et al. Cognitive and Language Development at Age 4–6 Years in Children HIV-Exposed But Uninfected Compared to Those HIV-Unexposed and to Children Living With HIV. *New Dir Child Adolesc Dev.* 2020;
203. Van Rie A, Mupuala A, Dow A. Impact of the HIV/AIDS epidemic on the neurodevelopment of preschool-aged children in Kinshasa, democratic Republic of the Congo. *Pediatrics.* 2008 Jul;122(1).
204. Kerr SJ, Puthanakit T, Vibol U, Aурpibul L, Vonthanak S, Kosalaraksa P, et al. Neurodevelopmental outcomes in HIV-exposed-uninfected children versus those not exposed to HIV. *AIDS Care - Psychol Socio-Medical Asp AIDS/HIV.* 2014;26(11):1327–35.
205. Nozyce ML, Huo Y, Williams PL, Kapetanovic S, Hazra R, Nichols S, et al. Safety of in utero and neonatal antiretroviral exposure: Cognitive and academic outcomes in HIV-exposed, Uninfected Children 5-13 Years of Age. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(11):1128–33.
206. Chaudhury S, Williams PL, Mayondi GK, Leidner J, Holding P, Tepper V, et al. Neurodevelopment of HIV-exposed and HIV-unexposed uninfected children at 24 months. *Pediatrics.* 2017 Oct 1;140(4).
207. Wu J, Li J, Li Y, Loo KK, Yang H, Wang Q, et al. Neurodevelopmental outcomes in young children born to HIV-positive mothers in rural Yunnan, China. *Pediatr Int.* 2018 Jul 1;60(7):618–25.
208. Le Roux SM, Donald KA, Brittain K, Phillips TK, Zerbe A, Nguyen KK, et al. Neurodevelopment of breastfed HIV-exposed uninfected and HIV-unexposed children in South Africa. *AIDS.* 2018;32(13):1781–91.
209. Piske M, Budd MA, Qiu AQ, Maan EJ, Sauv e LJ, Forbes JC, et al. Neurodevelopmental outcomes and in-utero antiretroviral exposure in HIV-exposed uninfected children. *AIDS.* 2018 Nov 13;32(17):2583–92.
210. McHenry MS, McAteer CI, Oyungu E, McDonald BC, Bosma CB, Mpofu PB, et al. Neurodevelopment in Young Children Born to HIV-Infected Mothers: A Meta-analysis. *Pediatrics.* 2018;141(2).
211. le Roux SM, Donald KA, Kroon M, Phillips TK, Lesosky M, Esterhuyse L, et al. HIV Viremia During Pregnancy and Neurodevelopment of HIV-Exposed Uninfected Children in the Context of Universal Antiretroviral Therapy and Breastfeeding: A Prospective Study. *Pediatr Infect Dis J.* 2019 Jan 1;38(1):70–5.
212. Mukherjee SB, Devamare, Seth AS, Sapra S. Development, Cognition, Adaptive Function and Maladaptive Behavior in HIV-infected and HIV-exposed Uninfected Children Aged 2-9 Years - PubMed. *Indian Pediatr.* 2019;56(11):933–7.

213. National Institutes of Health (NIH). FDA-Approved HIV Medicines [Internet]. Available from: <https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/fda-approved-hiv-medicines>
214. Hodel EM, Marzolini C, Waitt C, Rakhmanina N. Pharmacokinetics, Placental and Breast Milk Transfer of Antiretroviral Drugs in Pregnant and Lactating Women Living with HIV. *Curr Pharm Des.* 2019 Mar 21;25(5):556–76.
215. Olivero OA. Relevance of experimental models for investigation of genotoxicity induced by antiretroviral therapy during human pregnancy. *Mutat Res.* 2008 Jun 20;658(3):184–90.
216. Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol.* 1967 Mar 1;14(3):225-IN6.
217. Ball SG, Bhattacharya D, Weber APM. Pathogen to powerhouse. Vol. 351, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2016. p. 659–60.
218. Spang A, Saw JH, Jørgensen SL, Zaremba-Niedzwiedzka K, Martijn J, Lind AE, et al. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature.* 2015 May 14;521(7551):173–9.
219. Palikaras K, Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. Vol. 56, *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc.; 2014. p. 182–8.
220. Ding WX, Yin XM. Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. Vol. 393, *Biological Chemistry*. *Biol Chem*; 2012. p. 547–64.
221. Fernández-Vizarra E, Enríquez JA, Pérez-Martos A, Montoya J, Fernández-Silva P. Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion.* 2011 Jan;11(1):207–13.
222. Sauvanet C, Duvezin-Caubet S, di Rago JP, Rojo M. Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. Vol. 21, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2010. p. 558–65.
223. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell*. Molecular Biology of the Cell. 2002.
224. Logan DC. The mitochondrial compartment. *J Exp Bot.* 2007;58(1):1225–43.
225. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 2015;13(1):1–11.
226. Rolfe DFS, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 1997;77(3):731–58.
227. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961;191(4784):144–8.
228. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr Biol.* 2006;16(14):551–60.
229. Duchon M. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med.* 2004;25(4):365–451.
230. Farge GÉR, Falkenberg M. Organization of DNA in mammalian mitochondria. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
231. Kukat C, Wurm CA, Spähr H, Falkenberg M, Larsson NG, Jakobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 16;108(33):13534–9.
232. Kukat C, Davies KM, Wurm CA, Spähr H, Bonekamp NA, Kühl I, et al. Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Sep 8;112(36):11288–93.
233. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457–65.

234. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Vol. 23, *Nature Genetics*. Nat Genet; 1999. p. 147.
235. Yan, Duanmu, Zeng, Liu, Song. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*. 2019 Apr 25;8(4):379.
236. Taanman JW. The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 1999;1410(2):103–23.
237. Berk AJ, Clayton DA. Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: Asynchronous replication of strands, segregation of circular daughter molecules, aspects of topology and turnover of an initiation sequence. *J Mol Biol*. 1974 Jul 15;86(4):801–24.
238. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*. 2019 Feb 28;8(4).
239. Calvo SE, Mootha VK. The mitochondrial proteome and human disease. Vol. 11, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. NIH Public Access; 2010. p. 25–44.
240. Zinovkina LA. DNA Replication in Human Mitochondria. *Biochem*. 2019;84(8):884–95.
241. Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GI, Alexeyev MF. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(8):2539–48.
242. Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. Vol. 27, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Int J Biochem Cell Biol; 1995. p. 647–53.
243. Johnson AA, Johnson KA. Exonuclease Proofreading by Human Mitochondrial DNA Polymerase. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38097–107.
244. Longley MJ, Nguyen D, Kunkel TA, Copeland WC. The Fidelity of Human DNA Polymerase γ with and without Exonucleolytic Proofreading and the p53 Accessory Subunit. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38555–62.
245. Kunkel TA, Loeb LA. Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science (80-)*. 1981;213(4509):765–7.
246. Anderson AP, Luo X, Russell W, Yin YW. Oxidative damage diminishes mitochondrial DNA polymerase replication fidelity. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(2):817–29.
247. Harman D. The Free Radical Theory of Aging. *Antioxidants Redox Signal*. 2003;5(5):557–61.
248. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988;331(6158):717–9.
249. MITOMAP [Internet]. Available from: <https://www.mitomap.org/MITOMAP>
250. Douglas C. Wallace. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1405–12.
251. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. [Internet]. Vol. 30, *Human mutation*. 2009 [cited 2020 Oct 9]. p. e386–94. Available from: <http://www.phylotree.org>
252. Chinnery PF. Mitochondrial Disorders Overview Summary Genetic counseling. *Gene Rev*. 2014;1–21.
253. Finsterer J. Secondary manifestations of mitochondrial disorders. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2020;21(7):590–2.
254. Bris C, Desquirit-Dumas V, Gueguen N, Amati-Bonneau P, Reynier P, Procaccio V. Pathologies liées à des mutations de l'ADN mitochondrial. *Rev Francoph des Lab*. 2018;2018(505):71–80.
255. Schon EA, Dimauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(12):878–90.
256. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005;6(5):389–402.

257. Wallace DC. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? insights from evolutionary medicine. Vol. 76, Annual Review of Biochemistry. Annu Rev Biochem; 2007. p. 781–821.
258. Stefano G, Bjenning C, Wang F, Wang N, Kream RM. Mitochondrial Heteroplasmy. Adv Exp Med Biol. 2017;982(May):191–202.
259. Monzio Compagnoni G, Di Fonzo A, Corti S, Comi GP, Bresolin N, Masliah E. The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: the Lesson from Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease. Mol Neurobiol. 2020;57(7):2959–80.
260. Ramírez-Camacho I, García-Niño WR, Flores-García M, Pedraza-Chaverri J, Zazueta C. Alteration of mitochondrial supercomplexes assembly in metabolic diseases. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2020 Aug;165935.
261. Ganta KK, Chaubey B. Mitochondrial dysfunctions in HIV infection and antiviral drug treatment. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2019 Nov 18;0(ja):null.
262. Côté HCF, Brumme ZL, Craib KJP, Alexander CS, Wynhoven B, Ting L, et al. Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients. N Engl J Med. 2002 Mar 14;346(11):811–20.
263. Miura T, Goto M, Hosoya N, Odawara T, Kitamura Y, Nakamura T, et al. Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy. J Med Virol. 2003 Aug 1;70(4):497–505.
264. Subashini D, Dinesha TR, Srirama RB, Boobalan J, Poongulali S, Chitra DA, et al. Mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells in ART untreated & stavudine/zidovudine treated HIV-1-infected patients. Indian J Med Res. 2018 Aug 1;148(2):207–14.
265. Morén C, Garrabou G, Noguera-Julian A, Rovira N, Catalán M, Hernández S, et al. Study of oxidative, enzymatic mitochondrial respiratory chain function and apoptosis in perinatally HIV-infected pediatric patients. Drug Chem Toxicol. 2013;36(4):496–500.
266. Liu K, Sun Y, Liu D, Yin J, Qiao L, Shi Y, et al. Mitochondrial toxicity studied with the PBMC of children from the Chinese national pediatric highly active antiretroviral therapy cohort. PLoS One. 2013;8(2):e57223.
267. Shen J, Liberty A, Shiau S, Strehlau R, Pierson S, Patel F, et al. Mitochondrial Impairment in Well-Suppressed Children with Perinatal HIV-Infection on Antiretroviral Therapy. AIDS Res Hum Retroviruses. 2019;
268. Miró Ò, López S, Martínez E, Pedrol E, Milinkovic A, Deig E, et al. Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals. Clin Infect Dis. 2004 Sep 1;39(5):710–6.
269. Buffet M, Schwarzingler M, Amellal B, Gurlain K, Bui P, Prévot M, et al. Mitochondrial DNA depletion in adipose tissue of HIV-infected patients with peripheral lipodystrophy. J Clin Virol. 2005;33(1):60–4.
270. Casula M, Bosboom-Dobbelaer I, Smolders K, Otto S, Bakker M, De Baar MP, et al. Infection with HIV-1 induces a decrease in mtDNA. J Infect Dis. 2005 May 1;191(9):1468–71.
271. Saitoh A, Fenton T, Alvero C, Fletcher C V, Spector SA. Impact of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on mitochondria in human immunodeficiency virus type 1-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(12):4236–42.
272. Garrabou G, López S, Morén C, Martínez E, Fontdevila J, Cardellach F, et al. Mitochondrial damage in adipose tissue of untreated HIV-infected patients. AIDS. 2011 Jan 14;25(2):165–70.
273. Nasi M, Pinti M, Chiesa E, Fiore S, Manzini S, Del Giovane C, et al. Decreased mitochondrial DNA content in subcutaneous fat from HIV-infected women taking antiretroviral therapy as measured at delivery. Antivir Ther. 2011;16(3):365–72.
274. Morén C, Noguera-Julian A, Garrabou G, Catalán M, Rovira N, Tobías E, et al. Mitochondrial evolution in HIV-infected children receiving first- or second-generation nucleoside analogues. J Acquir Immune Defic Syndr. 2012 Jun 1;60(2):111–6.

275. Money DM, Wagner EC, Maan EJ, Chaworth-Musters T, Gadawski I, Van Schalkwyk JE, et al. Evidence of subclinical mtDNA alterations in HIV-infected pregnant women receiving combination antiretroviral therapy compared to HIV-negative pregnant women. *PLoS One*. 2015 Aug 6;10(8).
276. Garrabou G, Morén C, Gallego-Escuredo JM, Milinkovic A, Villarroya F, Negredo E, et al. Genetic and functional mitochondrial assessment of hiv-infected patients developing HAART-related hyperlactatemia. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Dec;52(4):443–51.
277. Flores SC, Marecki JC, Harper KP, Bose SK, Nelson SK, Mccord JM. Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese Superoxide dismutase in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Aug 15;90(16):7632–6.
278. Kruman II, Nath A, Mattson MP. HIV-1 protein tat induces apoptosis of hippocampal neurons by a mechanism involving caspase activation, calcium overload, and oxidative stress. *Exp Neurol*. 1998;154(2):276–88.
279. Viviani B, Corsini E, Binaglia M, Galli CL, Marinovich M. Reactive oxygen species generated by glia are responsible for neuron death induced by human immunodeficiency virus-glycoprotein 120 in vitro. *Neuroscience*. 2001 Nov 9;107(1):51–8.
280. Olivetta E, Pietraforte D, Schiavoni I, Minetti M, Federico M, Sanchez M. HIV-1 Nef regulates the release of superoxide anions from human macrophages. *Biochem J*. 2005 Sep 1;390(2):591–602.
281. Rozzi SJ, Avdoshina V, Fields JA, Trejo M, Ton HT, Ahern GP, et al. Human Immunodeficiency Virus Promotes Mitochondrial Toxicity. Vol. 32, *Neurotoxicity Research*. Springer New York LLC; 2017. p. 723–33.
282. El-Amine R, Germini D, Zakharova V V., Tsfasman T, Sheval E V., Louzada RAN, et al. HIV-1 Tat protein induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via mitochondrial ROS production. *Redox Biol*. 2018 May 1;15:97–108.
283. Tahrir FG, Shanmughapriya S, Ahooyi TM, Knezevic T, Gupta MK, Kontos CD, et al. Dysregulation of mitochondrial bioenergetics and quality control by HIV-1 Tat in cardiomyocytes. *J Cell Physiol*. 2018 Feb 1;233(2):748–58.
284. Teodorof-Diedrich C, Spector SA. Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 and Tat Induce Mitochondrial Fragmentation and Incomplete Mitophagy in Human Neurons. *J Virol*. 2018 Aug 29;92(22).
285. Bartley PB, Westacott L, Boots RJ, Lawson M, Potter JM, Hyland VJ, et al. Large hepatic mitochondrial DNA deletions associated with L-lactic acidosis and highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2001 Feb 16;15(3):419–20.
286. Martin AM, Hammond E, Nolan D, Pace C, Den Boer M, Taylor L, et al. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in human immunodeficiency virus-infected patients treated with nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors. *Am J Hum Genet*. 2003 Mar 1;72(3):549–60.
287. Maagaard A, Holberg-Petersen M, Kollberg G, Oldfors A, Sandvik L, Brunn JN. Mitochondrial (mt)DNA changes in tissue may not be reflected by depletion of mtDNA in peripheral blood mononuclear cells in HIV-infected patients. *Antivir Ther*. 2006;11(5):601–8.
288. Payne BAI, Wilson IJ, Hateley CA, Horvath R, Santibanez-Koref M, Samuels DC, et al. Mitochondrial aging is accelerated by anti-retroviral therapy through the clonal expansion of mtDNA mutations. *Nat Genet*. 2011 Aug;43(8):806–10.
289. Li M, Foli Y, Liu Z, Wang G, Hu Y, Lu Q, et al. High frequency of mitochondrial DNA mutations in HIV-infected treatment-experienced individuals. *HIV Med*. 2017 Jan 1;18(1):45–55.
290. López S, Miró O, Martínez E, Pedrol E, Rodríguez-Santiago B, Milinkovic A, et al. Mitochondrial effects of antiretroviral therapies in asymptomatic patients. *Antivir Ther*. 2004;9(1):47–55.
291. Miró Ò, López S, Pedrol E, Rodríguez-Santiago B, Martínez E, Soler A, et al. Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy. In: *Antiviral Therapy*. 2003. p. 333–8.

292. Nolan D, Hammond E, Martin A, Taylor L, Herrmann S, McKinnon E, et al. Mitochondrial DNA depletion and morphologic changes in adipocytes associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *AIDS*. 2003 Jun 13;17(9):1329–38.
293. Masyeni S, Sintya E, Megawati D, Sukmawati NMH, Budiayasa DGA, Aryastuti SA, et al. Evaluation of antiretroviral effect on mitochondrial DNA depletion among HIV-infected patients in Bali. *HIV/AIDS - Res Palliat Care*. 2018;10:145–50.
294. McComsey GA, Paulsen DM, Lonergan JT, Hessenthaler SM, Hoppel CL, Williams VC, et al. Improvements in lipoatrophy, mitochondrial DNA levels and fat apoptosis after replacing stavudine with abacavir or zidovudine. *AIDS*. 2005 Jan 3;19(1):15–23.
295. Mussini C, Pinti M, Bugarini R, Borghi V, Nasi M, Nemes E, et al. Effect of treatment interruption monitored by CD4 cell count on mitochondrial DNA content in HIV-infected patients: A prospective study. *AIDS*. 2005 Oct 14;19(15):1627–33.
296. Negro E, Garrabou G, Puig J, Lopez S, Morén C, Bellido R, et al. Partial immunological and mitochondrial recovery after reducing didanosine doses in patients on didanosine and tenofovir-based regimens. Vol. 13, *Antiviral Therapy*. 2008. p. 467.
297. Negro E, Miró Ó, Rodríguez-Santiago B, Garrabou G, Estany C, Masabeu A, et al. Improvement of mitochondrial toxicity in patients receiving a nucleoside reverse-transcriptase inhibitor - sparing strategy: Results from the multicenter study with nevirapine and kaletra (MULTTNEKA). *Clin Infect Dis*. 2009 Sep 15;49(6):892–900.
298. Noguera A, Morén C, Rovira N, Sánchez E, Garrabou G, Nicolàs M, et al. Evolution of mitochondrial DNA content after planned interruption of HAART in HIV-infected pediatric patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 Sep 1;26(9):1015–8.
299. Koczor CA, Lewis W. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor toxicity and mitochondrial DNA. Vol. 6, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. Expert Opin Drug Metab Toxicol; 2010. p. 1493–504.
300. Margolis AM, Heverling H, Pham PA, Stolbach A. A Review of the Toxicity of HIV Medications. Vol. 10, *Journal of Medical Toxicology*. Springer New York LLC; 2014. p. 26–39.
301. Ganta KK, Chaubey B. Mitochondrial dysfunctions in HIV infection and antiviral drug treatment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019 Dec 2;15(12):1043–52.
302. C.H. C, Vazquez-Padua M, Cheng YC. Effect of anti-human immunodeficiency virus nucleoside analogs on mitochondrial DNA and its implication for delayed toxicity. *Mol Pharmacol*. 1991;39(5):625–8.
303. Medina DJ, Tsai CH, Hsiung GD, Cheng YC. Comparison of mitochondrial morphology, mitochondrial DNA content, and cell viability in cultured cells treated with three anti-human immunodeficiency virus dideoxynucleosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(8):1824–8.
304. Pan-Zhou XR, Cui L, Zhou XJ, Sommadossi JP, Darley-USmar VM. Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Mar;44(3):496–503.
305. Stankov M V., Lücke T, Das AM, Schmidt RE, Behrens GMN. Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain activity in primary human subcutaneous adipocytes treated with nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):280–7.
306. Kakuda TN. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther*. 2000;22(6):685–708.
307. Velsor LW, Kovacevic M, Goldstein M, Leitner HM, Lewis W, Day BJ. Mitochondrial oxidative stress in human hepatoma cells exposed to stavudine. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Aug 15;199(1):10–9.
308. Day BJ, Lewis W. Oxidative stress in NRTI-induced toxicity: Evidence from clinical experience and experiments in vitro and in vivo. Vol. 4, *Cardiovascular Toxicology*. Cardiovasc Toxicol; 2004. p. 207–16.

309. Opii WO, Sultana R, Abdul HM, Ansari MA, Nath A, Butterfield DA. Oxidative stress and toxicity induced by the nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI)-2',3'-dideoxycytidine (ddC): Relevance to HIV-dementia. *Exp Neurol*. 2007 Mar;204(1):29–38.
310. Blas-García A, Martí-Rodrigo A, Víctor VM, Polo M, Alegre F, Funes HA, et al. The purine analogues abacavir and didanosine increase acetaminophen-induced hepatotoxicity by enhancing mitochondrial dysfunction. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Apr 1;71(4):916–26.
311. Smith RL, Tan JME, Jonker MJ, Jongejan A, Buissink T, Veldhuijzen S, et al. Beyond the polymerase- γ theory: Production of ROS as a mode of NRTI-induced mitochondrial toxicity. *PLoS One*. 2017 Nov 1;12(11).
312. Blas-García A, Apostolova N, Ballesteros D, Monleón D, Morales JM, Rocha M, et al. Inhibition of mitochondrial function by efavirenz increases lipid content in hepatic cells. *Hepatology*. 2010 Jul;52(1):115–25.
313. Apostolova N, Gomez-Sucerquia LJ, Moran A, Alvarez A, Blas-Garcia A, Esplugues J V. Enhanced oxidative stress and increased mitochondrial mass during Efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cells. *Br J Pharmacol*. 2010;160(8):2069–84.
314. Funes HA, Apostolova N, Alegre F, Blas-Garcia A, Alvarez A, Marti-Cabrera M, et al. Neuronal bioenergetics and acute mitochondrial dysfunction: A clue to understanding the central nervous system side effects of efavirenz. *J Infect Dis*. 2014;210(9):1385–95.
315. Pilon AA, Lum JJ, Sanchez-Dardon J, Phenix BN, Douglas R, Badley AD. Induction of apoptosis by a nonnucleoside human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2687–91.
316. Bumpus NN. Efavirenz and 8-hydroxyefavirenz induce cell death via a JNK- and BimEL-dependent mechanism in primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Dec 1;257(2):227–34.
317. Jin J, Grimmig B, Izzo J, Brown LAM, Hudson C, Smith AJ, et al. HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz reduces neural stem cell proliferation in vitro and in vivo. *Cell Transplant*. 2016;25(11):1967–77.
318. Imaizumi N, Kwang Lee K, Zhang C, Boelsterli UA. Mechanisms of cell death pathway activation following drug-induced inhibition of mitochondrial complex I. *Redox Biol*. 2015 Apr 1;4:279–88.
319. Weiß M, Kost B, Renner-Müller I, Wolf E, Mylonas I, Brüning A. Efavirenz Causes Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy in Endothelial Cells. *Cardiovasc Toxicol*. 2016 Jan 1;16(1):90–9.
320. Ganta KK, Mandal A, Chaubey B. Depolarization of mitochondrial membrane potential is the initial event in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz induced cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol*. 2017 Feb 1;33(1):69–82.
321. Wongtrakul J, Paemane A, Wintachai P, Thepparit C, Roytrakul S, Thongtan T, et al. Nevirapine induces apoptosis in liver (HepG2) cells. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Jun 1;9(6):547–53.
322. Paemane A, Sornjai W, Kittisenachai S, Sirinonthanawech N, Roytrakul S, Wongtrakul J, et al. Nevirapine induced mitochondrial dysfunction in HepG2 cells. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
323. Estaquier J, Lelièvre J-D, Petit F, Brunner T, Moutouh-de Parseval L, Richman DD, et al. Effects of Antiretroviral Drugs on Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced CD4+ T-Cell Death. *J Virol*. 2002 Jun 15;76(12):5966–73.
324. Tricarico PM, De Oliveira Franca RF, Pacor S, Ceglia V, Crovella S, Celsi F. HIV Protease Inhibitors Apoptotic Effect in SH-SY5Y Neuronal Cell Line. *Cell Physiol Biochem*. 2016 Sep 1;39(4):1463–70.
325. Ganta KK, Chaubey B. Endoplasmic reticulum stress leads to mitochondria-mediated apoptosis in cells treated with anti-HIV protease inhibitor ritonavir. *Cell Biol Toxicol*. 2019 Jun 15;35(3):189–204.
326. Gibellini L, De Biasi S, Pinti M, Nasi M, Riccio M, Carnevale G, et al. The protease inhibitor atazanavir triggers autophagy and mitophagy in human preadipocytes. *AIDS*. 2012 Oct 23;26(16):2017–26.

327. Taura M, Kariya R, Kudo E, Goto H, Iwawaki T, Amano M, et al. Comparative analysis of ER stress response into HIV protease inhibitors: Lopinavir but not darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:778–88.
328. Xiang T, Du L, Pham P, Zhu B, Jiang S. Nelfinavir, an HIV protease inhibitor, induces apoptosis and cell cycle arrest in human cervical cancer cells via the ROS-dependent mitochondrial pathway. *Cancer Lett.* 2015 Aug 1;364(1):79–88.
329. Gratton R, Tricarico PM, Guimaraes RL, Celsi F, Crovella S. Lopinavir/Ritonavir Treatment Induces Oxidative Stress and Caspase-independent Apoptosis in Human Glioblastoma U-87 MG Cell Line. *Curr HIV Res.* 2018 May 28;16(2):106–12.
330. Blanche S, Tardieu M, Rustin P, Slama A, Barret BE, Firtion G, et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet.* 1999 Sep 25;354(9184):1084–9.
331. Barret B, Tardieu M, Rustin P, Lacroix C, Chabrol B, Desguerre I, et al. Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-1-exposed but uninfected infants: Clinical screening in a large prospective cohort. *AIDS.* 2003 Aug 15;17(12):1769–85.
332. Brogly SB, Dimauro S, Van Dyke RB, Williams PL, Naini A, Libutti DE, et al. Short communication: Transplacental nucleoside analogue exposure and mitochondrial parameters in HIV-uninfected children. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011 Jul 1;27(7):777–83.
333. Divi RL, Walker VE, Wade NA, Nagashima K, Seilkop SK, Adams ME, et al. Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exposed in utero to Combivir. *AIDS.* 2004;18:1013–21.
334. Divi RL, Leonard SL, Kuo MM, Nagashima K, Thamire C, St. Claire MC, et al. Transplacentally exposed human and monkey newborn infants show similar evidence of nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Environ Mol Mutagen.* 2007;48(3–4):201–9.
335. Hernández S, Morén C, López M, Coll O, Cardellach F, Gratacós E, et al. Perinatal outcomes, mitochondrial toxicity and apoptosis in HIV-treated pregnant women and in-utero-exposed newborn. *AIDS.* 2012;26(4):419–28.
336. Noguera-Julian A, Morén C, Rovira N, Garrabou G, Catalán M, Sánchez E, et al. Decreased mitochondrial function among healthy infants exposed to antiretrovirals during gestation, delivery and the neonatal period. *Pediatr Infect Dis J.* 2015 Dec 1;34(12):1349–54.
337. McComsey GA, Kang M, Ross AC, Lebrecht D, Livingston E, Melvin A, et al. Increased mtDNA Levels Without Change in Mitochondrial Enzymes in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Infants Born to HIV-Infected Mothers on Antiretroviral Therapy. 2008;9(2):126–36.
338. Poirier MC, Divi RL, Al-Harhi L, Olivero OA, Nguyen V, Walker B, Landay AL, Walker VE, Charurat M BWW and ITS (WITS) G. Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infant born to HIV-infected mothers. *JAIDS.* 2003;33:175–83.
339. Aldrovandi GM, Chu C, Shearer WT, Li D, Walter J, Thompson B, et al. Antiretroviral Exposure and Lymphocyte mtDNA Content Among Uninfected Infants of HIV-1-Infected Women. *Pediatrics.* 2009;124(6):e1189–97.
340. Jao J, Powis KM, Kirmse B, Yu C, Epie F, Abrams EJ, et al. Metabolism in HIV-Exposed Uninfected Infants in Cameroon. *AIDS.* 2018;31(18):2475–81.
341. Ajaykumar A, Zhu M, Kakkar F, Brophy J, Bitnun A, Alimenti A, et al. Blood mitochondrial DNA levels remain elevated from birth to early life in children HIV-exposed uninfected exposed to combination antiretroviral therapy in utero. *J Infect Dis.* 2020;
342. Côté HCF, Raboud J, Bitnun A, Alimenti A, Money DM, Maan E, et al. Perinatal exposure to antiretroviral therapy is associated with increased blood mitochondrial DNA levels and decreased mitochondrial gene expression in infants. *J Infect Dis.* 2008;198(6):851–9.
343. Ross AC, Leong T, Avery A, Castillo-Duran M, Bonilla H, Lebrecht D, et al. Effects of in utero antiretroviral exposure on mitochondrial DNA levels, mitochondrial function and oxidative stress. *HIV Med.* 2012;23(1):1–7.

344. Kunz A, von Wurmb-Schwark N, Sewangi J, Ziske J, Lau I, Mbezi P, et al. Zidovudine exposure in HIV-1 infected Tanzanian women increases mitochondrial DNA levels in placenta and umbilical cords. *PLoS One*. 2012;7(7):e41637.
345. Budd MA, Calli K, Samson L, Bowes J, Hsieh AYY, Forbes JC, et al. Blood Mitochondrial DNA Content in HIV-Exposed Uninfected Children with Autism Spectrum Disorder. *Viruses*. 2018 Mar 16;10(2):77.
346. Jitratkosol MHJ, Sattha B, Maan EJ, Gadawski I, Harrigan PR, Forbes JC, et al. Blood mitochondrial DNA mutations in HIV-infected women and their infants exposed to HAART during pregnancy. *AIDS*. 2012 Mar 27;26(6):675–83.
347. Brogly SB, Ylitalo N, Mofenson LM, Oleske J, Van Dyke R, Crain MJ, et al. In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and signs of possible mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected children. *AIDS*. 2007 May;21(8):929–38.
348. Lawless C, Greaves L, Reeve AK, Turnbull DM, Vincent AE. The rise and rise of mitochondrial DNA mutations. *Open Biol*. 2020 May 1;10(5).
349. McComsey GA, Kang M, Ross AC, Lebrecht D, Livingston E, Melvin A, et al. Increased mtDNA levels without change in mitochondrial enzymes in peripheral blood mononuclear cells of infants born to HIV-infected mothers on antiretroviral therapy. *HIV Clin Trials*. 2008;9(2):126–36.
350. Divi RL, Doerge DR, Twaddle NC, Shockley ME, St. Claire MC, Harbaugh JW, et al. Metabolism and pharmacokinetics of the combination Zidovudine plus Lamivudine in the adult *Erythrocebus patas* monkey determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Jan 15;226(2):206–11.
351. Poirier MC, Olivero OA, Walker DM, Walker VE. Perinatal genotoxicity and carcinogenicity of anti-retroviral nucleoside analog drugs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;199(2):151–61.
352. Gerschenson M, Nguyen V, Ewings EL, Ceresa A, Shaw JA, St Claire MC, et al. Mitochondrial toxicity in fetal *Erythrocebus patas* monkeys exposed transplacentally to zidovudine plus lamivudine. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20(1):91–100.
353. Divi RL, Leonard SL, Kuo MM, Nagashima K, Thamire C, Claire MCS, et al. Transplacentally Exposed Human and Monkey Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Induced mitochondrial toxicity. *Environ Mol Mutagen*. 2007;48:201–9.
354. Divi RL, Leonard SL, Walker BL, Kuo MM, Shockley ME, St Claire MC, et al. *Erythrocebus patas* monkey offspring exposed perinatally to NRTIs sustain skeletal muscle mitochondrial compromise at birth and at 1 year of age. *Toxicol Sci An Off J Soc Toxicol*. 2007;99(1):203–13.
355. Gerschenson M, Erhart SW, Paik CY, Claire MCST, Nagashima K, Skopets B, et al. Fetal Mitochondrial Heart and Skeletal Muscle Damage in *Erythrocebus patas* Monkeys Exposed in Utero. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16(7):635–44.
356. Liu Y, Shim Park E, Gibbons AT, Shide ED, Divi RL, Woodward RA, et al. Mitochondrial compromise in 3-year old *patas* monkeys exposed in utero to human-equivalent antiretroviral therapies. *Environ Mol Mutagen*. 2016 Dec 15;57(7):526–34.
357. Gerschenson M, Poirier MC. Fetal *patas* monkeys sustain mitochondrial toxicity as a result of in utero zidovudine exposure. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;918:269–82.
358. Ewings EL, Gerschenson M, St Claire MC, Nagashima K, Skopets B, Harbaugh SW, et al. Genotoxic and functional consequences of transplacental zidovudine exposure in fetal monkey brain mitochondria. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;24(2):100–5.
359. Poirier MC, Gibbons AT, Rugeles MT, Andre-schmutz I, Blanche S, Section I, et al. Fetal consequences of maternal antiretroviral nucleoside reverse transcriptase inhibitor use in human and nonhuman primate pregnancy. *Curr Opin Pediatr*. 2016;27(2):233–9.
360. Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 23;12(3).
361. Turner K, Vasu V, Griffin D. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells*. 2019;8(1):73.

362. McClintock B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics*. 1941;26(2):234–82.
363. Müller H. The remaking of chromosomes. *Collect net Woods Hole*. 1938;13:191–8.
364. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*. 1978 Mar 25;120(1):33–53.
365. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)(n), present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6622–6.
366. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)(n) among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(18):7049–53.
367. Gomes NMV, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, et al. Comparative biology of mammalian telomeres: Hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell*. 2011 Oct 1;10(5):761–8.
368. de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, et al. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*. 1990 Feb;10(2):518–27.
369. Mefford HC, Trask BJ. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet*. 2002;3(2):91–102.
370. Kwapisz M, Morillon A. Subtelomeric Transcription and its Regulation. *Journal of Molecular Biology*. Academic Press; 2020.
371. Toubiana S, Selig S. Human subtelomeric DNA methylation: regulation and roles in telomere function. Vol. 60, *Current Opinion in Genetics and Development*. Elsevier Ltd; 2020. p. 9–16.
372. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*. 1997 Mar 7;88(5):657–66.
373. McElligott R, Wellinger RJ. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J*. 1997;16(12):3705–14.
374. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999 May 14;97(4):503–14.
375. Doksan Y, Wu JY, De Lange T, Zhuang X. XSuper-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):345.
376. Lin C, Yang D. Human telomeric G-quadruplex structures and G-quadruplex-interactive compounds. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2017. p. 171–96.
377. Oganessian L, Karlseder J. Telomeric armor: The layers of end protection. *J Cell Sci*. 2009 Nov 15;122(22):4013–25.
378. De Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. Vol. 326, *Science*. NIH Public Access; 2009. p. 948–52.
379. Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem*. 2004 Dec 3;279(49):51338–42.
380. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet*. 2019 May 1;20(5):299–309.
381. Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*. 1972 Oct 18;239(94):197–201.
382. Olovnikov A. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*. 1973;41(1).
383. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965 Mar 1;37(3):614–36.

384. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*. 1989 Nov 3;59(3):521–9.
385. Pestana A, Vinagre J, Sobrinho-Simões M, Soares P. TERT biology and function in cancer: Beyond immortalisation. Vol. 58, *Journal of Molecular Endocrinology*. BioScientifica Ltd.; 2017. p. R129–46.
386. Cooke HJ, Smith BA. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51(1):213–9.
387. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 1996;18(2):173–9.
388. Ulaner G. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol Hum Reprod*. 1997;3(9):769–73.
389. Choudhary B, Karande AA, Raghavan SC. Telomere and telomerase in stem cells: Relevance in ageing and disease. *Front Biosci - Sch*. 2012 Jan 1;4 S(1):16–360.
390. Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Kanaya T, Sagawa T, Kohama T, et al. Expression of telomerase activity in human chorion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Dec 18;241(2):498–503.
391. Izutsu T, Kudo T, Sato T, Nishiya I, Ohyashiki K, Mori M, et al. Telomerase activity in human chorionic villi and placenta determined by TRAP and in situ TRAP assay. *Placenta*. 1998;19(8):613–8.
392. Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res*. 1997 Feb 15;57(4):610–4.
393. Broccoli D, Young JW, De Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9082–6.
394. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 1995;155(8):3711–5.
395. Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, et al. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells*. 1996;14(2):239–48.
396. Greenwood MJ, Lansdorp PM. Telomeres, telomerase, and hematopoietic stem cell biology. Vol. 34, *Archives of Medical Research*. Elsevier Inc.; 2003. p. 489–95.
397. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*. 1995;85(9):2315–20.
398. Valenzuela HF, Effros RB. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin Immunol*. 2002 Nov 1;105(2):117–25.
399. Sheng WY, Chien YL, Wang TC V. The dual role of protein kinase C in the regulation of telomerase activity in human lymphocytes. *FEBS Lett*. 2003 Apr 10;540(1–3):91–5.
400. Lin J, Epel E, Cheon J, Kroenke C, Sinclair E, Bigos M, et al. Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: Insights for epidemiology of telomere maintenance. *J Immunol Methods*. 2010 Jan 31;352(1–2):71–80.
401. Hiyama E, Hiyama K, Tatsumoto N, Kodama T, Shay JW, Yokoyama T. Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol*. 1996;9(3):453–8.
402. Härle-Bachor C, Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 25;93(13):6476–81.
403. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (80-)*. 1994;266(5193):2011–5.
404. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 12;91(8):2900–4.

405. Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, Hiyama K, Hiyama E, Wright WE, et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Methods Cell Sci.* 1995 Mar;17(1):1–15.
406. Telomerase activity in human breast tumors - PubMed [Internet]. [cited 2020 Jul 16]. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/8537972/>
407. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas - PubMed [Internet]. [cited 2020 Jul 16]. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/7796395/>
408. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 1995 Sep;14(17):4240–8.
409. Cell Biosci Z, Zhang J-M, Zou L. Alternative lengthening of telomeres: from molecular mechanisms to therapeutic outlooks. 2020;
410. Frencck RW, Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 12;95(10):5607–10.
411. Zeichner SL, Palumbo P, Feng YR, Xiao X, Gee D, Sleasman J, et al. Rapid telomere shortening in children. *Blood.* 1999;93(9):2824–30.
412. Bosquet Enlow M, Kane-Grade F, De Vivo I, Petty CR, Nelson CA. Patterns of change in telomere length over the first three years of life in healthy children. *Psychoneuroendocrinology.* 2020 May 1;115.
413. Herrmann M, Pusceddu I, März W, Herrmann W. Telomere biology and age-related diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(8):1210–22.
414. Wang J, Liu Y, Xia Q, Xia Q, Wang B, Yang C, et al. Potential roles of telomeres and telomerase in neurodegenerative diseases. *Int J Biol Macromol.* 2020 Nov;163:1060–78.
415. Eguchi K, Honig LS, Lee JH, Hoshida S, Kario K. Short telomere length is associated with renal impairment in Japanese subjects with cardiovascular risk. *PLoS One.* 2017;12(4):1–13.
416. Barnard A, Moch A, Saab S. Relationship between telomere maintenance and liver disease. Vol. 13, *Gut and Liver*. Editorial Office of Gut and Liver; 2019. p. 11–5.
417. Ameh OI, Okpechi IG, Dandara C, Kengne AP. Association between Telomere Length, Chronic Kidney Disease, and Renal Traits: A Systematic Review. Vol. 21, *OMICS A Journal of Integrative Biology*. Mary Ann Liebert Inc.; 2017. p. 143–55.
418. Qi Nan W, Ling Z, Bing C. The influence of the telomere-telomerase system on diabetes mellitus and its vascular complications. Vol. 19, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. Informa Healthcare; 2015. p. 849–64.
419. Fernandes SG, Dsouza R, Pandya G, Kirtonia A, Tergaonkar V, Lee SY, et al. Role of Telomeres and Telomeric Proteins in Human Malignancies and Their Therapeutic Potential. *Cancers (Basel).* 2020 Jul 14;12(7):1901.
420. Shamma MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Cur Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(1):28–34.
421. McGrath M, Wong JYY, Michaud D, Hunter DJ, De Vivo I. Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Apr;16(4):815–9.
422. Astuti Y, Wardhana A, Watkins J, Wulaningsih W. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ Res.* 2017;158:480–9.
423. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet (London, England).* 2005;366(9486):662–4.
424. Pavanello S, Hoxha M, Dioni L, Bertazzi PA, Snenghi R, Nalesso A, et al. Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. *Int J Cancer.* 2011 Aug 15;129(4):983–92.

425. Yamaki N, Matsushita S, Hara S, Yokoyama A, Hishimoto A, Higuchi S. Telomere shortening in alcohol dependence: Roles of alcohol and acetaldehyde. *J Psychiatr Res.* 2019 Feb 1;109:27–32.
426. Dixit S, Whooley MA, Vittinghoff E, Roberts JD, Heckbert SR, Fitzpatrick AL, et al. Alcohol consumption and leukocyte telomere length. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1).
427. Martins de Carvalho L, Wiers CE, Manza P, Sun H, Schwandt M, Wang GJ, et al. Effect of alcohol use disorder on cellular aging. *Psychopharmacology (Berl).* 2019 Nov 1;236(11):3245–55.
428. Cheng GLF, Zeng H, Leung M-K, Zhang H-J, Lau BWM, Liu Y-P, et al. Heroin abuse accelerates biological aging: a novel insight from telomerase and brain imaging interaction. *Transl Psychiatry.* 2013 Jun 23;3(5):e260–e260.
429. Yang Z, Ye J, Li C, Zhou D, Shen Q, Wu J, et al. Drug addiction is associated with leukocyte telomere length. *Sci Rep.* 2013;3:1542.
430. Levandowski ML, Tractenberg SG, de Azeredo LA, De Nardi T, Rovaris DL, Bau CHD, et al. Crack cocaine addiction, early life stress and accelerated cellular aging among women. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2016 Nov 3;71:83–9.
431. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet.* 2005 Aug 20;366(9486):662–4.
432. Carulli L, Anzivino C, Baldelli E, Zenobii MF, Rocchi MBL, Bertolotti M. Telomere length elongation after weight loss intervention in obese adults. *Mol Genet Metab.* 2016 Jun 1;118(2):138–42.
433. Tam BT, Morais JA, Santosa S. Obesity and ageing: Two sides of the same coin. Vol. 21, *Obesity Reviews.* Blackwell Publishing Ltd; 2020.
434. Shammass MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011 Jan;14(1):28–34.
435. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. *Arch Intern Med.* 2008 Jan 28;168(2):154–8.
436. Ludlow AT, Zimmerman JB, Witkowski S, Hearn JW, Hatfield BD, Roth SM. Relationship between physical activity level, telomere length, and telomerase activity. *Med Sci Sports Exerc.* 2008;40(10):1764–71.
437. Puterman E, Lin J, Blackburn E, O'Donovan A, Adler N, Epel E. The power of exercise: Buffering the effect of chronic stress on telomere length. *PLoS One.* 2010;5(5).
438. Semeraro MD, Smith C, Kaiser M, Levinger I, Duque G, Gruber HJ, et al. Physical activity, a modulator of aging through effects on telomere biology. *Aging (Albany NY).* 2020 Jun 23;12.
439. Lee AG, Cowell W, Kannan S, Ganguri HB, Nentin F, Wilson A, et al. Prenatal particulate air pollution and newborn telomere length: Effect modification by maternal antioxidant intakes and infant sex. *Environ Res.* 2020 Aug 1;187.
440. Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, et al. Telomere Shortening and Mood Disorders: Preliminary Support for a Chronic Stress Model of Accelerated Aging. *Biol Psychiatry.* 2006 Sep 1;60(5):432–5.
441. Epel ES. Psychological and metabolic stress: A recipe for accelerated cellular aging? Vol. 8, *Hormones.* Hellenic Endocrine Society; 2009. p. 7–22.
442. Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Su Y, et al. Leukocyte telomere length in major depression: Correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress - preliminary findings. *PLoS One.* 2011;6(3).
443. Oliveira BS, Zunzunegui MV, Quinlan J, Fahmi H, Tu MT, Guerra RO. Systematic review of the association between chronic social stress and telomere length: A life course perspective. Vol. 26, *Ageing Research Reviews.* Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 37–52.

444. Hunt SC, Chen W, Gardner JP, Kimura M, Srinivasan SR, Eckfeldt JH, et al. Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: The National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study. *Aging Cell*. 2008 Aug;7(4):451–8.
445. Diez Roux A V., Ranjit N, Jenny NS, Shea S, Cushman M, Fitzpatrick A, et al. Race/ethnicity and telomere length in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Aging Cell*. 2009;8(3):251–7.
446. Zhu H, Wang X, Gutin B, Davis CL, Keeton D, Thomas J, et al. Leukocyte telomere length in healthy caucasian and african-american adolescents: Relationships with race, sex, adiposity, adipokines, and physical activity. *J Pediatr*. 2011 Feb;158(2):215–20.
447. Rewak M, Buka S, Prescott J, De Vivo I, Loucks EB, Kawachi I, et al. Race-related health disparities and biological aging: Does rate of telomere shortening differ across blacks and whites? *Biol Psychol*. 2014;99(1):92–9.
448. Factor-Litvak P, Susser E, Kezios K, McKeague I, Kark JD, Hoffman M, et al. Leukocyte Telomere Length in Newborns: Implications for the Role of Telomeres in Human Disease. *Pediatrics*. 2016 Nov 19;137(4).
449. Barrett ELB, Richardson DS. Sex differences in telomeres and lifespan. Vol. 10, *Aging Cell*. *Aging Cell*; 2011. p. 913–21.
450. Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, et al. Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol*. 2014;51(1):15–27.
451. Andrew T, Aviv A, Falchi M, Surdulescu GL, Gardner JP, Lu X, et al. Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs. *Am J Hum Genet*. 2006;78(3):480–6.
452. Massimo Mangino, Shih-Jen Hwang, Timothy D Spector, Steven C Hunt, Masayuki Kimura, Annette L Fitzpatrick, Lene Christiansen, Inge Petersen, Clara C Elbers, Tamara Harris, Wei Chen, Sathanur R Srinivasan, Jeremy D Kark, Athanase Benetos, Said El Shamieh, AA. Genome-wide meta-analysis points to CTC1 and ZNF676 as genes regulating telomere homeostasis in humans. *Hum Mol Genet*. 2012;
453. Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet*. 2013 Apr;45(4):422–7.
454. Wang S, Chang E, Byanyima P, Huang P, Sanyu I, Musisi E, et al. Association between common telomere length genetic variants and telomere length in an African population and impacts of HIV and TB. 2019;64(10):1033–40.
455. van de Berg PJEJ, Griffiths SJ, Yong S-L, Macaulay R, Bemelman FJ, Jackson S, et al. Cytomegalovirus Infection Reduces Telomere Length of the Circulating T Cell Pool. *J Immunol*. 2010 Apr 1;184(7):3417–23.
456. Appay V, Almeida JR, Sauce D, Autran B, Papagno L. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. Vol. 42, *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc.; 2007. p. 432–7.
457. Bhatia R, Ryscavage P, Taiwo B. Accelerated aging and human immunodeficiency virus infection: Emerging challenges of growing older in the era of successful antiretroviral therapy. Vol. 18, *Journal of NeuroVirology*. *J Neuroviro*; 2012. p. 247–55.
458. Torres RA, Lewis W. Aging and HIV/AIDS: Pathogenetic role of therapeutic side effects. *Lab Investig*. 2014 Feb;94(2):120–8.
459. Dalzini A, Petrara MR, Ballin G, Zanchetta M, Giaquinto C, De Rossi A. Biological Aging and Immune Senescence in Children with Perinatally Acquired HIV. *J Immunol Res*. 2020;2020.
460. Chiappini E, Bianconi M, Dalzini A, Petrara MR, Galli L, Giaquinto C, et al. Accelerated aging in perinatally HIV-infected children: clinical manifestations and pathogenetic mechanisms. *Aging (Albany NY)*. 2018 Jan 10;10(11):3610–25.
461. Nichols WS, Schneider S, Chan RCK, Farthing CF, Daar ES. Increased CD4+ T-lymphocyte senescence fraction in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. *Scand J Immunol*. 1999;49(3):302–6.

462. Pathai S, Lawn SD, Gilbert CE, McGuinness D, McGlynn L, Weiss HA, et al. Accelerated biological ageing in HIV-infected individuals in South Africa: A case-control study. *Aids*. 2013;27(15):2375–84.
463. Leeansyah E, Cameron PU, Solomon A, Tennakoon S, Velayudham P, Gouillou M, et al. Inhibition of telomerase activity by human immunodeficiency virus (HIV) nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors: A potential factor contributing to HIV-associated accelerated aging. *J Infect Dis*. 2013;207(7):1157–65.
464. Zanet DAL, Thorne A, Singer J, Maan EJ, Sattha B, Le Campion A, et al. Association Between Short Leukocyte Telomere Length and HIV Infection in a Cohort Study: No Evidence of a Relationship With Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis*. 2014;58(9):1322–32.
465. Liu JCY, Leung JM, Ngan DA, Nashta NF, Guillemi S, Harris M, et al. Absolute leukocyte telomere length in HIV-infected and uninfected individuals: Evidence of accelerated cell senescence in HIV-associated chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2015;10(4):1–13.
466. Auld E, Lin J, Chang E, Byanyima P, Ayakaka I, Musisi E, et al. HIV infection is associated with shortened telomere length in ugandans with suspected tuberculosis. *PLoS One*. 2016;11(9):1–14.
467. Minami R, Takahama S, Yamamoto M. Correlates of telomere length shortening in peripheral leukocytes of HIV-infected individuals and association with leukoaraiosis. *PLoS One*. 2019;14(6):1–11.
468. Babu H, Ambikan AT, Gabriel EE, Akusjärvi SS, Palaniappan AN, Sundaraj V, et al. Systemic inflammation and the increased risk of inflamm-aging and age-associated diseases in people living with HIV on long term suppressive antiretroviral therapy. *Front Immunol*. 2019;10(AUG):1–11.
469. Montejano R, Stella-Ascariz N, Monge S, Bernardino JJ, Pérez-Valero I, Montes ML, et al. Impact of Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitors on Blood Telomere Length Changes in a Prospective Cohort of Aviremic HIV-Infected Adults. *J Infect Dis*. 2018;218(10):1531–40.
470. Côté HCF, Soudeyns H, Thorne A, Alimenti A, Lamarre V, Maan EJ, et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected and HIV-Exposed uninfected children: Shorter telomeres with uncontrolled HIV viremia. *PLoS One*. 2012;7(7).
471. Vignoli M, Stecca B, Furlini G, Re M C, Mantovani V, Zauli G, et al. Impaired telomerase activity in uninfected haematopoietic progenitors in HIV-1-infected patients. *AIDS*. 1998;12(9):999–1005.
472. Ballon G, Ometto L, Righetti E, Cattelan AM, Masiero S, Zanchetta M, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Modulates Telomerase Activity in Peripheral Blood Lymphocytes. *J Infect Dis*. 2001 Feb;183(3):417–24.
473. Gonzalez-Serna A, Ajaykumar A, Gadawski I, Muñoz-Fernández MA, Hayashi K, Harrigan PR, et al. Rapid decrease in peripheral blood mononucleated cell telomere length after HIV seroconversion, but not HCV seroconversion. Vol. 76, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2017. p. e29–32.
474. Leung JM, Fishbane N, Jones M, Morin A, Xu S, Liu JCY, et al. Longitudinal study of surrogate aging measures during human immunodeficiency virus seroconversion. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(3):687–705.
475. Pace GW, Leaf CD. The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(4):523–8.
476. Deeks SG, Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK, Schaftenaar F, et al. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Aids*. 2013;27(3):1263–72.
477. Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. Vol. 27, *Trends in Biochemical Sciences*. Trends Biochem Sci; 2002. p. 339–44.
478. Justice AC. HIV and aging: Time for a new paradigm. Vol. 7, *Current HIV/AIDS Reports*. Curr HIV/AIDS Rep; 2010. p. 69–76.
479. Franzese O, Adamo R, Pollicita M, Comandini A, Laudisi A, Perno CF, et al. Telomerase activity, hTERT expression, and phosphorylation are downregulated in CD4+ T lymphocytes infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *J Med Virol*. 2007 May 1;79(5):639–46.
480. Gianna Ballon, Lucia Ometto, Elisabetta Righetti AMC, Masiero S, Zanchetta M, Ross LC-B and ADR. Human immunodeficiency virus type 1 modulates telomerase activity in peripheral blood lymphocytes. *J Infect Dis*. 2001 Jan 10;

481. Reynoso R, Mincez L, Salomon H, Quarleri J. HIV-1 infection downregulates nuclear telomerase activity on lymphoblastoid cells without affecting the enzymatic components at the transcriptional level. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006 May;22(5):425–9.
482. Comandini A, Naro C, Adamo R, Akbar AN, Lanna A, Bonmassar E, et al. Molecular mechanisms involved in HIV-1-Tat mediated inhibition of telomerase activity in human CD4(+) T lymphocytes. *Mol Immunol*. 2013;54(2):181–92.
483. Franzese O, Comandini A, Adamo R, Sgadari C, Ensoli B, Bonmassar E. HIV-Tat down-regulates telomerase activity in the nucleus of human CD4+ T cells [1]. *Cell Death Differ*. 2004;11(7):782–4.
484. Peng Y, Mian IS, Lue NF. Analysis of telomerase processivity: Mechanistic similarity to HIV-1 reverse transcriptase and role in telomere maintenance. *Mol Cell*. 2001;7(6):1201–11.
485. Gillis AJ, Schuller AP, Skordalakes E. Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature*. 2008;455(7213):633–7.
486. Yamaguchi T, Takayama Y, Saito M, Ishikawa F, Saneyoshi M. Telomerase-inhibitory effects of the triphosphate derivatives of some biologically active nucleosides. *Nucleic Acids Res Suppl*. 2001;(1):211–2.
487. Hukezalie KR, Thumati NR, Côté HCF, Wong JMY. In vitro and ex vivo inhibition of human telomerase by anti-HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) but not by non-NRTIs. *PLoS One*. 2012;7(11):e47505.
488. Brown T, Sigurdson E, Rogatko A, Broccoli D. Telomerase inhibition using azidothymidine in the HT-29 colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol*. 2003;10(8):910–5.
489. Enomoto L, Anderson PL, Li S, Edelstein CL, Weinberg A. Effect of nucleoside and nucleotide analog reverse transcriptase inhibitors on cell-mediated immune functions. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Jan 1;27(1):47–55.
490. Brüning A, Burger P, Gengelmaier A, Mylonas I. The HIV reverse transcriptase inhibitor tenofovir induces cell cycle arrest in human cancer cells. *Invest New Drugs*. 2012 Aug;30(4):1389–95.
491. Imam T, Jitratkosol MHJ, Soudeyns H, Sattha B, Gadawski I, Maan E, et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected pregnant women treated with antiretroviral drugs during pregnancy and their uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;60(5):495–502.
492. Gianesin K, Noguera-Julian A, Zanchetta M, Del Bianco P, Petrara MR, Freguja R, et al. Premature aging and immune senescence in HIV-infected children. *AIDS*. 2016;30(9):1363–73.
493. Stella-Ascariz N, Montejano R, Pintado-Berninches L, Monge S, Bernardino JI, Pérez-Valero I, et al. Brief Report: Differential Effects of Tenofovir, Abacavir, Emtricitabine, and Darunavir on Telomerase Activity in Vitro. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017 Jan 1;74(1):91–4.
494. Montejano R, Stella-Ascariz N, Monge S, Bernardino JI, Pérez-Valero I, Montes ML, et al. Impact of antiretroviral treatment containing tenofovir difumarate on the telomere length of aviremic HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;76(1):102–9.
495. Olivero OA, Anderson LM, Diwan BA, Haines DC, Harbaugh SW, Moskal TJ, et al. Transplacental effects of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT): tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(21):1602–8.
496. Olivero OA, Fernandez JJ, Antiochos BB, Wagner JL, St. Claire ME, Poirier MC. Transplacental genotoxicity of combined antiretroviral nucleoside analogue therapy in *Erythrocebus patas* monkeys. Vol. 29, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2002. p. 323–9.
497. Poirier MC, Divi RL, Al-Harhi L, Olivero OA, Nguyen V, Walker B, et al. Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. Vol. 33, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2003. p. 175–83.
498. Ajaykumar A, Soudeyns H, Kakkar F, Brophy J, Bitnun A, Alimenti A, et al. Leukocyte Telomere Length at Birth and During the Early Life of Children Exposed to but Uninfected With HIV After In Utero Exposure to Antiretrovirals. *J Infect Dis*. 2018;217(5):710–20.

499. Shiao S, Strehlau R, Shen J, Violari A, Patel F, Liberty A, et al. Biomarkers of aging in HIV-infected children on suppressive antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2018;78(5):549–56.
500. Wang Y, Brummel SS, Beilstein-Wedel E, Dagnall CL, Hazra R, Kacanek D, et al. Association between zidovudine-containing antiretroviral therapy exposure in utero and leukocyte telomere length at birth. *AIDS*. 2019;33(13):2091–6.
501. Zheng Q, Huang J, Wang G. Mitochondria, Telomeres and Telomerase Subunits. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Dec 2;7.
502. Zhu Y, Liu X, Ding X, Wang F, Geng X. Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. Vol. 20, *Biogerontology*. Springer Netherlands; 2019.
503. Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett*. 1999 Jun 25;453(3):365–8.
504. Saretzki G, Murphy MP, von Zglinicki T. MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging Cell*. 2003;2(2):141–3.
505. Liu L, Trimarchi JR, Smith PJS, Keefe DL. Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. *Aging Cell*. 2002;1(1):40–6.
506. Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, et al. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol*. 2007 May;5(5):1138–51.
507. Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J, Müller FL, Guo M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*. 2011 Feb 17;470(7334):359–65.
508. Dabrowska A, Venero JL, Iwasawa R, Hankir M, khair, Rahman S, Boobis A, et al. PGC-1 α controls mitochondrial biogenesis and dynamics in lead-induced neurotoxicity. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(9):629–47.
509. Gomes AP, Price NL, Ling AJY, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, et al. Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*. 2013 Dec 19;155(7):1624–38.
510. Fang EF, Scheibye-Knudsen M, Brace LE, Kassahun H, Sengupta T, Nilsen H, et al. Defective mitophagy in XPA via PARP-1 hyperactivation and NAD⁺/SIRT1 reduction. *Cell*. 2014 May 8;157(4):882–96.
511. Saretzki G. Extra-telomeric Functions of Human Telomerase: Cancer, Mitochondria and Oxidative Stress. *Curr Pharm Des*. 2014 Oct 15;20(41):6386–403.
512. Rosen J, Jakobs P, Ale-Agha N, Altschmied J, Haendeler J. Non-canonical functions of Telomerase Reverse Transcriptase – Impact on redox homeostasis. Vol. 34, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2020.
513. Santos JH, Meyer JN, Van Houten B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Hum Mol Genet*. 2006 Jun;15(11):1757–68.
514. Santos JH, Meyer JN, Skorvaga M, Annab LA, Van Houten B. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. *Aging Cell*. 2004 Dec;3(6):399–411.
515. Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T, Brings S, Peters H, et al. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci*. 2008 Apr 1;121(7):1046–53.
516. Haendeler J, Dröse S, Büchner N, Jakob S, Altschmied J, Goy C, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jun;29(6):929–35.
517. Bollmann FM. Telomerase inhibition may contribute to accelerated mitochondrial aging induced by anti-retroviral HIV treatment. *Med Hypotheses*. 2013 Aug;81(2):285–7.
518. Li M, Foli Y, Amakye NY, Klein T, Selvaraj S, Lu L, et al. Antiretroviral therapy-induced toxicity is associated with increased mRNA expression of telomerase. *J Clin Pharmacol*. 2015 Oct 1;55(10):1119–24.

519. Hsieh AYY, Kimmel E, Pick N, Sauvé L, Brophy J, Kakkar F, et al. Inverse relationship between leukocyte telomere length attrition and blood mitochondrial DNA content loss over time. *Aging (Albany NY)*. 2020;12:1–26.
520. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10).
521. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(3).
522. Martin-Ruiz CM, Baird D, Roger L, Boukamp P, Kronic D, Cawthon R, et al. Reproducibility of telomere length assessment: An international collaborative study. *Int J Epidemiol*. 2015 Oct 1;44(5):1673–83.
523. O’Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online*. 2011 Jun 22;13(1):3.
524. Foissac F, Blume J, Tréluyer J-M, Tylleskär T, Kankasa C, Meda N, et al. Are Prophylactic and Therapeutic Target Concentrations Different? The Case of Lopinavir/ritonavir or Lamivudine Administered to Infants for the Prevention of Mother-to-Child HIV-1 Transmission during Breastfeeding. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;
525. Hoek JB, Cahill A, Pastorino JG. Alcohol and mitochondria: A dysfunctional relationship. *Gastroenterology*. 2002;122(7):2049–63.
526. Monographie de KALETRA ® [Internet]. Available from: https://www.abbvie.ca/content/dam/abbvie-dotcom/ca/fr/documents/products/KALETRA_PM_FR.pdf
527. Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, Belmont JW, Smith EOB, Neish SR, et al. Clinical Spectrum, Morbidity, and Mortality in 113 Pediatric Patients with Mitochondrial Disease. Vol. 114, *Pediatrics*. Pediatrics; 2004. p. 925–31.
528. Ventura-Clapier R, Moulin M, Piquereau J, Lemaire C, Mericskay M, Veksler V, et al. Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. *Clin Sci (London, Engl 1979)*. 2017;131(9):803–22.
529. Côté HCF, Soudeyins H, Thorne A, Alimenti A, Lamarre V, Maan EJ, et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected and HIV-exposed uninfected children: shorter telomeres with uncontrolled HIV viremia. *PLoS One*. 2012;7(7):e39266.
530. Gianesin K, Noguera-Julian A, Zanchetta M, Del Bianco P, Petrara MR, Freguja R, et al. Premature aging and immune senescence in HIV-infected children. *AIDS*. 2016;30(9):1363–73.
531. Brogly SB, Ylitalo N, Mofenson LM, Oleske J, Van Dyke R, Crain MJ, et al. In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and signs of possible mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected children. *AIDS*. 2007;21(8):929–38.
532. Sagna T, Bisseye C, Compaore TR, Kagone TS, Djigma FW, Ouermi D, et al. Prevention of mother-to-child HIV-1 transmission in Burkina Faso: evaluation of vertical transmission by PCR, molecular characterization of subtypes and determination of antiretroviral drugs resistance. *Glob Health Action*. 2015;8:26065.
533. Hu DJ, Baggs J, Downing RG, Pieniazek D, Dorn J, Fridlund C, et al. Predominance of HIV-1 subtype A and D infections in Uganda. *Emerg Infect Dis*. 2000 Jan 5;6(6):609–15.
534. Wilkinson E, Rasmussen D, Ratmann O, Stadler T, Engelbrecht S, de Oliveira T. Origin, imports and exports of HIV-1 subtype C in South Africa: A historical perspective. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2016;46:200–8.
535. Goudenège D, Bris C, Hoffmann V, Desquirit-Dumas V, Jardel C, Rucheton B, et al. eKLIPse: a sensitive tool for the detection and quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequencing data. *Genet Med*. 2019 Jun 1;21(6):1407–16.
536. Olivero OA, Torres LR, Gorjifard S, Momot D, Marrogi E, Divi RL, et al. Perinatal exposure of patas monkeys to antiretroviral nucleoside reverse-transcriptase inhibitors induces genotoxicity persistent for up to 3 years of age. *J Infect Dis*. 2013;208(2):244–8.

537. Eisenberg DTA, Lee NR, Rej PH, Hayes MG, Kuzawa CW. Older paternal ages and grandpaternal ages at conception predict longer telomeres in human descendants. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2019 May 29;286(1903).
538. De Meyer T, Rietzschel ER, De buyzere ML, De Bacquer D, Van Criekinge W, De Backer GG, et al. Paternal age at birth is an important determinant of offspring telomere length. *Hum Mol Genet.* 2007 Dec 15;16(24):3097–102.
539. Birungi N, Fadnes LT, Engebretsen IMS, Tumwine JK, Åstrøm AN. Antiretroviral treatment and its impact on oral health outcomes in 5 to 7 year old Ugandan children. *Medicine (Baltimore).* 2020 Sep 25;99(39):e22352.
540. South African National Department of Health. *Guideline for the Prevention of Mother to Child Transmission of Communicable Infections.* 2019.
541. Republic of Zambia M of H. *Zambia Consolidated Guidelines for Treatment and Prevention of HIV Infection.* 2020.
542. Onyango-Makumbi C, Owora AH, Mwiru RS, Mwatha A, Young AM, Moodley D, et al. Extended Prophylaxis With Nevirapine Does Not Affect Growth in HIV-Exposed Infants. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2019;82(4):377–85.
543. Blanche S, Tylleskär T, Peries M, Kankasa C, Engebretsen I, Meda N, et al. Growth in HIV-1-exposed but uninfected infants treated with lopinavir-ritonavir versus lamivudine: a secondary analysis of the ANRS 12174 trial. *lancet HIV.* 2019;6(5):e307–14.
544. Kariyawasam D, Peries M, Foissac F, Eymard-Duvernay S, Tylleskär T, Singata-Madliki M, et al. Lopinavir-Ritonavir Impairs Adrenal Function in Infants. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2019;
545. World Health Organization. *Antiretroviral therapy for HIV infection in infants and children:towards universal access. Recommandations for a public health approach.* 2010 version. 2010.
546. World Health Organization. *Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommandations for a public health approach.* June 2013. 2013.
547. World Health Organization. *Guidelines for the prevention care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection.* 2015.

Annexes

Article 1

Supplementary Materials

Results details: Quality control of DNA

In the PrEP group, sixteen out of the 200 CHEU initially selected were excluded from the analyses because they failed of quality control after checking for nuclear DNA degradation at D7 and W50 (seven at D7 and nine at W50). In the sub-analysis, one South African child from the PrEP group (LPV/r arm) was also removed after checking for DNA degradation at W6 and W26.

In the main analysis, Spearman's rank-order correlation test revealed that platelet count did not influence MCN at any point in time, except for in Zambia at D7. In fact, Rho correlation coefficients at D7 were 0.06 for Burkina Faso ($p = 0.71$), 0.01 for Uganda ($p = 0.97$), -0.06 for South Africa ($p = 0.69$) and 0.37 ($p = 0.01$) for Zambia. At W50, Rho correlation coefficients were 0.04 for Burkina Faso ($p = 0.81$), -0.004 for South Africa ($p = 0.98$), 0.27 for Uganda ($p = 0.08$) and 0.18 for Zambia ($p = 0.25$). It was previously reported that altitude increased MCN and Zambia has the highest elevation site in the study (1279 meters above sea level) [1, 2]. Therefore, because the experimental design of our study was not applicable to Zambian samples, we ruled this site out from the analyses, leaving a total of 139 CHEU. In the sub-analysis, Rho correlation coefficients were -0.11 ($n = 45$, 2 missing platelet count values, $p = 0.48$) at W6 and 0.21 ($n = 45$, 2 missing platelet count values, $p = 0.16$) at W26.

We further validated that platelet count did not influence MCN by applying the formula described by Hurtado et al. on the value at D7 [3]. These values did not differ from the raw values. We obtained an overall median difference of 3.1% and an interquartile range (IQR) of 1.96 to 4.71.

Reference

1. Prabhakar, A.; Chatterjee, T.; Bajaj, N.; Tyagi, T.; Sahu, A.; Gupta, N.; Kumari, B.; Nair, V.; Kumar, B.; Ashraf, M.Z. Venous thrombosis at altitude presents with distinct biochemical profiles: a comparative study from the Himalayas to the plains. *Blood Adv* **2019**, *3*, 3713–3723, doi:10.1182/bloodadvances.2018024554.
2. Hui, L.; Rong, W.; Zheng-Ping, J.; Juan, X.; Hua, X. Effects of High Altitude Exposure on Physiology and Pharmacokinetics. *Curr Drug Metab* **2016**, *17*, 559–565, doi:10.2174/1389200216666151015113948.
3. Hurtado-Roca, Y.; Ledesma, M.; Gonzalez-Lazaro, M.; Moreno-Loshuertos, R.; Fernandez-Silva, P.; Enriquez, J.A.; Laclaustra, M. Adjusting MtDNA quantification in whole blood for peripheral blood platelet and leukocyte counts. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163770, doi:10.1371/journal.pone.0163770.

Supplementary Figures

A

Primers	DNA (ng)	Mean Ct (<i>n</i> = 16)	Standard Deviation	95% CI (Lower Bound)	95% CI (Upper Bound)
MITO	0.1	30.12	1.59	29.34	30.89
	0.5	28.04	1.11	27.49	28.49
	1	27.07	0.63	26.76	27.38
	5	24.86	0.45	24.64	25.08
	10	23.91	0.39	23.71	24.10
	50	21.56	0.17	21.48	21.65
	100	20.26	0.56	19.98	20.53
DEL	0.1	28.84	1.40	28.40	29.28
	0.5	27.06	0.82	26.59	27.53
	1	26.52	0.44	26.10	26.94
	5	23.65	0.26	23.42	23.89
	10	22.70	0.18	22.53	22.86
	50	20.31	0.16	20.20	20.41
	100	18.93	0.18	18.71	19.15

B

Primers	Parameters	Mean	Standard Deviation	95% CI (Lower Bound)	95% CI (Upper Bound)
MITO	Slope	-3.14	0.22	-3.62	-3.20
	Efficiency	1.97	0.08	1.89	2.05
	Y-intercept	27.12	0.62	26.51	27.73
	R ²	0.93	0.02	0.91	0.96
DEL	Slope	-3.71	0.16	-3.87	-3.55
	Efficiency	1.86	0.05	1.81	1.92
	Y-intercept	25.99	0.46	25.54	26.44
	R ²	0.96	0.02	0.94	0.98

Figure S1. Descriptive statistics of the mitochondrial DNA deletion assay. **(A)** Descriptive statistics for sixteen standard replicate analysed on four independent runs **(B)** Descriptive statistics for the qPCR: slope, efficiency, Y-intercept and R². Abbreviations: Ct, cycle threshold; CI, confidence interval.

	DNA (ng)	Mean Ct	MITO		DEL		
			Standard Deviation	%CV	Mean Ct	Standard Deviation	%CV
Reproducibility	0.1	30.12	1.59	5.27	28.84	0.90	3.12
	0.5	28.04	1.11	3.97	27.06	0.96	3.55
	1	27.07	0.63	2.34	26.52	0.85	3.21
	5	24.86	0.45	1.79	23.65	0.48	2.03
	10	23.91	0.39	1.63	22.70	0.33	1.45
	50	21.56	0.17	0.79	20.31	0.21	1.03
	100	20.26	0.56	2.78	18.93	0.44	2.32
			2.65%			2.39%	
Repeatability	0.1	30.12	1.40	4.66	28.84	0.80	2.76
	0.5	28.04	0.82	2.93	27.06	0.64	2.37
	1	27.07	0.44	1.62	26.52	0.60	2.25
	5	24.86	0.26	1.06	23.65	0.29	1.22
	10	23.91	0.18	0.73	22.70	0.20	0.89
	50	21.56	0.16	0.74	20.31	0.08	0.39
	100	20.26	0.18	0.88	18.93	0.10	0.54
			1.80%			1.49%	

Figure S2. Intra- and inter-run variations of the mitochondrial DNA deletion assay. Reproducibility was estimated for 16 replicates and repeatability for 4 replicates of 4 independent runs. Abbreviations: Ct, cycle threshold; CV, coefficient of variation.

Supplementary Tables

Table S1. Children's characteristics at PrEP randomisation (D7) in Burkina Faso.

Characteristic	LPV/r (<i>n</i> = 23)	3TC (<i>n</i> = 23)	Total (<i>n</i> = 46)	<i>p</i> Value ^a
Gender; <i>n</i> (%)				0.76
Male	13 (56.5)	14 (60.9)	27 (58.7)	
Weight (kg); mean ± SD	2.99 ± 0.37	3.02 ± 0.39	3.00 ± 0.36	0.76
Height (cm); mean ± SD	49.2 ± 1.8	49.1 ± 2.2	49.2 ± 2.0	0.88
Gestational age (week); mean ± SD	37.5 ± 2.0	37.7 ± 2.1	37.6 ± 2.0	0.83
Preterm birth (week); <i>n</i> (%)				0.37
No prematurity ≥37	15 (65.2)	12 (52.2)	27 (58.7)	
Prematurity <37	8 (37.8)	11 (47.8)	19 (41.3)	
Hæmoglobin (g/dL); median [IQR]	15.2 [14.2;17.2]	15.6 [14.0;17.2]	15.3 [14.2;17.2]	0.95
ALT (U/L); <i>n</i> (%)				0.35
Normal ≤40	19 (82.6)	22 (95.7)	41 (89.1)	
Abnormal >40	4 (17.4)	1 (4.3)	5 (10.9)	
Mild]40;100]	2 (8.7)	1 (4.3)	-	
Moderate]100;200]	2 (8.7)	-	-	
Hæmoglobin (g/dL); <i>n</i> (%)				0.23
Normal >13	23 (100.0)	20 (87.0)	43 (93.5)	
Anemia ≤13	-	3 (13.0)	3 (6.5)	
Mild [12;13]	-	3 (13.0)	-	
Platelet count (10 ³ /mm ³); <i>n</i> (%)				1.00
Normal ≥125	22 (95.7)	-	45 (97.8)	
Thrombocytopenia <125	1 (4.3)	-	1 (2.2)	
Mild [100;125[1 (4.3)	-	1 (2.2)	
White cell count (10 ³ /mm ³); <i>n</i> (%)				NA
Normal >2.5	23 (100.0)	23 (100.0)	46 (100.0)	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); <i>n</i> (%)				NA
Normal >1.5	23 (100.0)	23 (100.0)	46 (100.0)	

^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Student's t-test or Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: PrEP, Pre-exposure prophylaxis; D7, day 7; SD, standard deviation; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; ALT Alanine Aminotransferase, NA non applicable.

Table S2. Maternal characteristics at randomisation (D7) and during follow up in Burkina Faso.

Characteristic	LPV/r (n = 23)	3TC (n = 23)	Total (n = 46)	p Value ^a
At randomisation				
<i>Social demographic characteristics</i>				
Age (year); median [IQR]	26.8 [25.0;31.8]	28.2 [25.0;34.2]	28.0 [25.0;33.0]	0.23
Parity; median [IQR]	3.0 [2.0;4.0]	3.0 [2.0;5.0]	3.0 [2.0;4.0]	0.32
<i>Clinical and biological characteristics</i>				
BMI; median [IQR]	23.0 [20.7;24.2]	22.1 [21.1;24.5]	22.5 [21.0;24.2]	0.93
CD4 cells count (cells/mm ³); median [IQR]	706.5 [492.5;839.0] [†]	604.0 [489.0;729.0] [‡]	617.0 [489.0;811.0] [§]	0.56
HIV viral load (Log copies/mL); median [IQR]	2.9 [2.2;3.5]	2.2 [2.2;3.0]	2.6 [2.2;3.5]	0.28
HIV viral load control; n (%)				0.12
Controlled <1000 copies/mL	12 (52.2)	18 (78.3)	30 (65.2)	
Uncontrolled ≥1000 copies/mL	11 (47.8)	5 (21.7)	16 (34.8)	
WHO HIV staging; n (%)				1.00
Stage 1	21 (91.3)	21 (91.3)	42 (91.3)	
Stage 2	2 (8.7)	2 (8.7)	4 (8.7)	
<i>Antiretroviral prophylaxis</i>				
ARV prophylaxis during pregnancy; n (%)				1.00
ZDV	22 (95.7)	22 (95.7)	44 (95.7)	
No ARV prophylaxis	1 (4.3)	1 (4.3)	2 (4.3)	
Duration of ARV prophylaxis taken during pregnancy (week); median [IQR]	7.5 [5.0;10.0]	6.5 [4.0;10.0]	7.5 [5.0;10.0]	0.83
During the trial				
HIV viral load at W38 (Log copies/mL); median [IQR]	4.7 [3.4;5.5]	4.5 [2.2;5.2]	4.6 [3.2;5.3]	0.42
HIV viral load control at W38; n (%)				0.72
Controlled <1000 copies/mL	4 (17.4)	6 (26.1)	10 (21.7)	
Uncontrolled ≥1000 copies/mL	19 (82.6)	17 (73.9)	36 (78.3)	
Duration of breastfeeding (week); median [IQR]	47.9 [46.1;49.7]	47.4 [46.6;50.6]	47.7 [46.6;49.7]	0.94

† three missing values, ‡ four missing values, § seven missing values. ^a Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: D7, day 7; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; BMI, body mass index; HIV, Human immunodeficiency virus; WHO, World Health Organization; ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine; W38, week 38.

Table S3. Children's characteristics at PrEP randomisation (D7) in South Africa.

Characteristic	LPV/r (n = 20)	3TC (n = 28)	Total (n = 48)	p Value ^a
Gender; n (%)				0.41
Male	11 (55.0)	12 (42.9)	23 (48.0)	
Weight (kg); mean ± SD	3.2 ± 0.5	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.5	0.18
Height (cm); mean ± SD	48.5 ± 1.7	49.5 ± 1.9	49.1 ± 1.9	0.06
Gestational age (week); mean ± SD	37.8 ± 1.0	38.0 ± 1.5	37.9 ± 1.3	0.67
Preterm birth (week); n (%)				0.68
No prematurity ≥37	17 (85.0)	25 (89.3)	42 (87.5)	
Prematurity <37	3 (15.0)	3 (10.7)	6 (12.5)	
Hæmoglobin (g/dL); median [IQR]	16.5 [15.8;18.2]	17.1 [14.3;19.0] [†]	16.9 [15.1;18.7] [†]	0.81
ALT (U/L); n (%)				1.00
Normal ≤40	19 (95.0)	26 (92.9)	45 (93.8)	
Abnormal >40	1 (5.0)	2 (7.1)	3 (6.2)	
Mild]40;100]	1 (5.0)	1 (3.6)	2 (4.2)	
Moderate]100;200]	-	1 (3.6)	1 (2.1)	
Hæmoglobin (g/dL); n (%)				0.84
Normal >13	18 (90.0)	25 (92.6) [‡]	43 (91.5) [‡]	
Anemia ≤13	2 (10.0)	2 (7.4) [‡]	4 (8.5) [‡]	
Mild [12;13]	1 (5.0)	1 (3.7) [‡]	2 (4.3) [‡]	
Moderate [10;12[-	1 (3.7) [‡]	1 (2.1) [‡]	
Very severe [0;9[1 (5.0)	-	1 (2.1) [‡]	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.46
Normal ≥125	16 (80.0)	22 (91.7) [‡]	38 (86.4) [‡]	
Thrombocytopenia <125	4 (20.0)	2 (8.3) [‡]	6 (13.6) [‡]	
Mild [100;125[2 (10.0)	2 (8.3) [‡]	4 (9.1) [‡]	
Moderate [50;100[1 (5.0)	-	1 (2.3) [‡]	
Very severe [0;25[1 (5.0)	-	1 (2.3) [‡]	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >2.5	20 (100.0)	26 (100.0) [§]	46 (100.0) [§]	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >1.5	20 (100.0)	26 (100.0) [§]	46 (100.0) [§]	

† one missing value, ‡ four missing values, § two missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Student's t-test or Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: PrEP, Pre-exposure prophylaxis; D7, day 7; SD, standard deviation; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; ALT Alanine Aminotransferase, NA non applicable.

Table S4. Maternal characteristics at randomisation (D7) and during follow up in South Africa.

Characteristic	LPV/r (n = 20)	3TC (n = 28)	Total (n = 48)	p value ^a
At randomisation				
<i>Social demographic characteristics</i>				
Age (year); median [IQR]	28.4 [22.4;34.1]	30.0 [24.5;33.9]	29.3 [24.1;34.1]	0.71
Parity; median [IQR]	2.0 [1.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	0.37
<i>Clinical and biological characteristics</i>				
BMI; median [IQR]	28.0 [24.3;33.2]	28.3 [23.4;33.3]	28.0 [24.2;33.2]	0.84
CD4 cells count (cells/mm ³); median [IQR]	420.0 [363.0;672.0] [†]	529.0 [393.0;805.5] [‡]	495.0 [389.0;710.0] [§]	0.30
HIV viral load (Log copies/mL); median [IQR]	2.2 [2.2;3.5]	2.5 [2.2;3.5]	2.2 [2.2;3.5]	0.83
HIV viral load control; n (%)				0.76
Controlled <1000 copies/mL	13 (65.0)	17 (60.7)	30 (62.5)	
Uncontrolled ≥1000 copies/mL	7 (35.0)	11 (39.3)	18 (37.5)	
WHO HIV staging; n (%)				NA
Stage 1	20 (100.0)	28 (100.0)	48 (100.0)	
<i>Antiretroviral prophylaxis</i>				
ARV prophylaxis during pregnancy; n (%)				NA
ZDV	20 (100.0)	28 (100.0)	48.0 (100.0)	
Duration of ARV prophylaxis taken during pregnancy (week); median [IQR]	13.5 [8.0;19.5]	14.0 [8.5;16.0]	13.5 [8.0;17.0]	0.66
<i>During the trial</i>				
HIV viral load at W38 (Log copies/mL); median [IQR]	3.3 [2.4;4.0]	3.5 [2.8;4.4]	3.4 [2.7;4.2]	0.52
HIV viral load control at W38; n (%)				0.76
Controlled <1000 copies/mL	7 (35.0)	11 (39.3)	18 (37.5)	
Uncontrolled ≥1000 copies/mL	13 (65.0)	17 (60.7)	30 (62.5)	
Duration of breastfeeding (week); median [IQR]	36.7 [28.3;48.1]	46.0 [33.4;49.8]	44.7 [31.1;49.4]	0.14

[†] one missing value, [‡] four missing values, [§] five missing values. ^a Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: D7, day 7; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; BMI, body mass index; HIV, Human immunodeficiency virus; WHO, World Health Organization; ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine; W38, week 38.

Table S5. Children's characteristics at PrEP randomisation (D7) in Uganda.

Characteristic	LPV/r (n = 21)	3TC (n = 24)	Total (n = 45)	p Value ^a
Gender; n (%)				0.45
Male	9 (42.9)	13 (54.2)	22 (48.9)	
Weight (kg); mean ± SD	3.2 ± 0.5	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.5	0.34
Height (cm); mean ± SD	49.9 ± 2.4	50.9 ± 1.6	50.4 ± 2.0	0.10
Gestational age (week); mean ± SD	39.8 ± 1.0	39.6 ± 0.8	39.9 ± 1.1	0.34
Preterm birth (week); n (%)				NA
No prematurity ≥37	21 (100.0)	24 (100.0)	45 (100.0)	
Hæmoglobin (g/dL); median [IQR]	16.6 [15.4;17.2]	16.0 [15.1;17.0]	16.4 [15.2;17.1]	0.37
ALT (U/L); n (%)				0.49
Normal ≤40	-	22 (91.7)	43 (95.6)	
Abnormal >40	-	2 (8.3)	2 (4.4)	
Mild]40;100]	-	2 (8.3)	2 (4.4)	
Hæmoglobin (g/dL); n (%)				0.49
Normal >13	-	22 (91.7)	43 (95.6)	
Anemia ≤13	-	2 (8.3)	2 (4.4)	
Mild [12;13]	-	2 (8.3)	2 (4.4)	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal ≥125	21 (100.0)	24 (100.0)	45 (100.0)	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >2.5	21 (100.0)	24 (100.0)	45 (100.0)	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.21
Normal >1.5	19 (90.5)	-	43 (95.6)	
Neutropenia ≤1.5	2 (9.5)	-	2 (4.4)	
Mild [1.25;1.5]	1 (4.8)	-	1 (2.2)	
Moderate [1.0;1.25[1 (4.8)	-	1 (2.2)	

^a Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Student's t-test or Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: PrEP, Pre-exposure prophylaxis; D7, day 7; SD, standard deviation; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; ALT Alanine Aminotransferase, NA non applicable.

Table S6. Maternal characteristics at randomisation (D7) and during follow up in Uganda.

Characteristic	LPV/r (n = 21)	3TC (n = 24)	Total (n = 45)	p Value ^a
At randomisation				
<i>Social demographic characteristics</i>				
Age (year); median [IQR]	25.2 [24.1;28.7]	27.6 [23.7;30.7]	26.3 [24.1;30.2]	0.48
Parity; median [IQR]	3.0 [3.0;4.0]	2.0 [2.0;5.5]	3.0 [2.0;4.0]	0.50
<i>Clinical and biological characteristics</i>				
BMI; median [IQR]	22.6 [21.1;24.6]	22.9 [20.9;24.1]	22.8 [21.0;24.4]	0.81
CD4 cells count (cells/mm ³); median [IQR]	578.5 [471.0;858.0] [†]	536.0 [436.0;786.0] [‡]	565.5 [442.5;802.5] [§]	0.44
HIV viral load (Log copies/mL); median [IQR]	2.2 [2.2;3.0]	2.2 [2.2;3.2] [¶]	2.2 [2.2;3.1] [¶]	0.83
HIV viral load control; n (%)				0.85
Controlled <1000 copies/mL	15 (71.4)	17 (70.8) [¶]	32 (72.7) [¶]	
Uncontrolled ≥1000 copies/mL	6 (28.6)	6 (26.1) [¶]	12 (27.3) [¶]	
WHO HIV staging; n (%)				1.00
Stage 1	19 (90.5)	22 (91.7)	41 (91.1)	
Stage 2	2 (9.5)	2 (8.3)	4 (8.9)	
<i>Antiretroviral prophylaxis</i>				
ARV prophylaxis during pregnancy; n (%)				0.29
ZDV	3 (14.3)	1 (4.2)	4 (8.9)	
ZDV + 3TC	11 (52.4)	18 (75.0)	29 (64.4)	
No ARV prophylaxis	7 (33.3)	5 (20.8)	12 (26.7)	
Duration of ARV prophylaxis taken during pregnancy (week); median [IQR]	5.0 [4.0;11.0]	6.0 [4.0;8.0]	6.0 [4.0;8.0]	0.82
During the trial				
HIV viral load at W38 (Log copies/mL); median [IQR]	3.0 [2.2;4.4]	2.2 [2.2;3.8]	2.2 [2.2;4.0]	0.08
HIV viral load control at W38; n (%)				0.20
Controlled <1000 copies/mL	10 (47.6)	16 (66.7)	26 (57.8)	
Uncontrolled ≥1000 copies/mL	11 (52.4)	8 (33.3)	19 (42.2)	
Duration of breastfeeding (week); median [IQR]	42.4 [39.1;45.4]	37.9 [33.4;42.9]	41.4 [33.4;44.9]	0.14

† three missing values, ‡ two missing values, § five missing values, ¶ one missing value. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: D7, day 7; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; BMI, body mass index ; HIV, Human immunodeficiency virus ; WHO, World Health Organization; ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine; W38, week 38.

Table S7. mtDNA content at randomisation (D7) according to the gender.

Site	PrEP	<i>n</i>	Female median [IQR]	<i>n</i>	Male median [IQR]	<i>p</i> Value ^a
Burkina Faso	All	19	895 [700;1128]	27	947 [648;1112]	0.96
	LPV/r	10	897 [811;1253]	13	969 [757;1061]	0.74
	3TC	9	833 [700;1034]	14	866 [648;1112]	1.00
South Africa	All	25	458 [322;782]	23	565 [337;1031]	0.43
	LPV/r	9	566 [458;796]	11	682 [436;1220]	0.82
	3TC	16	422 [244;691]	12	418 [273;762]	0.70
Uganda	All	23	921 [783;1101]	22	1024 [852;1099]	0.45
	LPV/r	12	948 [813;1048]	9	1004 [846;1143]	0.60
	3TC	11	908 [774;1129]	13	1045 [911;1095]	0.65
All	All	67	811 [527;1034]	72	907 [560;1089]	0.29
	LPV/r	31	865 [683;1083]	33	947 [555;1162]	0.72
	3TC	36	761 [439;992]	39	880 [566;1076]	0.27

^a Wilcoxon Mann-Whitney test.

Table S8. Description of children' and maternal characteristics in South Africa.

Characteristic	Control group (<i>n</i> = 38)	PrEP group (<i>n</i> = 47)			<i>p</i> Value ^a
Children					
At W6					
		LPV/r (<i>n</i> = 19)	3TC (<i>n</i> = 28)	Total (<i>n</i> = 47)	
Gender; <i>n</i> (%)					0.92
Male	19 (50.0)	10 (52.6)	13 (46.4)	23 (48.9)	
Province of South Africa					<0.01
Eastern Cape	6 (15.8)	19 (100.0)	28 (100.0)	47 (100.0)	
Others	32 (84.2)	-	-	-	
Weight (kg); mean ± SD	4.7 ± 1.0 [†]	4.5 ± 0.6 [‡]	4.7 ± 0.6 [‡]	4.6 ± 0.6 [§]	0.14
Height (cm); mean ± SD	53.1 ± 5.2 [¶]	53.1 ± 1.7 [‡]	54.0 ± 1.9 [‡]	53.7 ± 1.8 [§]	0.73
Gestational age (week); mean ± SD	37.0 ± 3.0 [†]	37.8 ± 1.0	38.0 ± 1.5	37.9 ± 1.3	0.53
Preterm birth (week); <i>n</i> (%)					0.02
No prematurity ≥37	15 (65.2) [†]	16 (84.2)	26 (92.9)	42 (89.4)	
Prematurity <37	8 (34.8) [†]	3 (15.8)	2 (7.1)	5 (10.6)	
Mother					
At W6					
Age (year); median [IQR]	26.0 [23.0;30.0]	29.1 [22.5;34.4]	30.0 [23.5;33.9]	29.5 [23.0;34.4]	0.08
Parity; median [IQR]	2.0 [2.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	0.09
During the study					
Breastfeeding					<0.01
Yes	21 (75.0) [£]	19 (100.0)	28 (100.0)	47 (100.0)	
No	7 (25.0) [£]	-	-	-	
Duration of breastfeeding; median; <i>n</i> (%)					0.82
<39 weeks	10 (35.7) [£]	10 (52.6)	8 (28.6)	18 (38.3)	
≥39 weeks	18 (64.3) [£]	9 (47.4)	20 (71.4)	29 (61.7)	

† five missing values, ‡ one missing value, § six missing values, ¶ twenty-seven missing values, † fifteen missing values, £ ten missing values. ^a Wilcoxon Mann-Whitney test and Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate for comparison between "Control group" (*n* = 38) versus "PrEP group" (*n* = 47). Abbreviations: PrEP, pre-exposure prophylaxis; W6, week 6; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; SD, standard deviation.

Article 2

Supplementary Materials

Result details: Quality control of DNA

Seven children from Burkina Faso and seven from Uganda failed the quality control after checking for nuclear DNA degradation at each time point and were so excluded from the analyses. All the values showed no correlation with the platelet count. Spearman's Rho coefficients for Burkina Faso were -0.012 ($p = 0.44$) at day-7 and 0.06 ($p = 0.68$) at year-6. Spearman's Rho coefficients for Uganda were 0.02 ($p = 0.89$) at day-7 and 0.009 ($p = 0.96$) at year-6. Hurtado's formula confirmed that platelet count did not influence MCN as the median difference between the raw value and the adjusted value did not vary from more than 3.0% with an interquartile range of [1.8;4.0] at day-7 and 6.4% [4.5;8.1] at year-6.

Supplementary Table S1. Characteristics of CHEU from the PROMISE PEP trial enrolled in the study and CHEU not enrolled.

Characteristic	CHEU enrolled (<i>n</i> = 86)	CHEU not enrolled (<i>n</i> = 173)	<i>p</i> Value ^a
Socio-demographics			
Age (in years); median [IQR]	6.0 [5.0-6.0]	6.0 [5.0-6.0]	0.35
Site; <i>n</i> (%)			<0.01
Burkina Faso	43 (50.0)	52 (30.1)	
Uganda	43 (50.0)	121 (69.9)	
Gender; <i>n</i> (%)			0.69
Male	44 (51.2)	44 (48.6)	
Anthropometrics			
Weight (kg); mean ± SD	19.9 ± 2.9 †	19.0 ± 2.8	0.01
Height (cm); mean ± SD	115.7 ± 6.2 †	113.3 ± 6.5	<0.01
WAZ; mean ± SD	-0.5 ± 0.9 †	-0.7 ± 0.9	0.06
HAZ; mean ± SD	-0.3 ± 1.0 †	-0.6 ± 1.1	0.03
BMIZ; mean ± SD	-0.4 ± 0.9 †	-0.5 ± 0.9	0.78
Hematology			
Hemoglobin concentration (g/dL); <i>n</i> (%)			0.86
Normal >10.4	80 (93.0)	163 (94.2)	
Anemia ≤10.4	6 (7.0)	-	
Mild [10.4-9.5[5 (5.8)	7 (4.1)	
Moderate [9.5-8.5[1 (1.2)	2 (1.2)	
Severe [8.5-6.5[1 (0.6)	
Platelet count (10 ³ /mm ³); mean ± SD	358.4 ± 110.2	353.0 ± 114.2	0.72
Platelet count (10 ³ /mm ³); <i>n</i> (%)			0.70
Normal >125	86 (100.0)	169 (97.7)	
Thrombocytopenia ≥ 125	-	4 (2.3)	
Mild [125-100[-	1 (0.6)	
Moderate [100-50[-	3 (1.7)	

Leucocyte count ($10^3/\text{mm}^3$); <i>n</i> (%)			NA
Normal >2.5	86 (100.0)	173 (100.0)	
Neutrophil count ($10^3/\text{mm}^3$); <i>n</i> (%)			1.00
Normal >1.0	84 (97.7)	169 (97.7)	
Neutropenia ≤ 1.0	2 (2.3)	4 (2.3)	
Mild [1.0-0.79[2 (2.3)	3 (1.7)	
Very severe <0.4	-	1 (0.6)	
Biochemistry; <i>n</i> (%)			
LDH concentration (ULN)			0.31
Normal < ULN	27 (31.4)	41 (23.7)	
Abnormal \geq ULN	59 (68.6)	132 (76.3)	
Mild [1-2[xULN	59 (68.6)	130 (75.1)	
Moderate ≥ 2 xULN	-	2 (1.2)	
ALT concentration (ULN)			0.54
Normal < 1.25xULN	84 (97.7)	170 (98.3)	
Abnormal ≥ 1.25 xULN	2 (2.3)	3 (1.7)	
Mild [1.25-2.5[xULN	1 (1.16)	3 (1.7)	
Moderate [2.5-5.0[xULN	1 (1.16)	-	
Medical events; <i>n</i> (%)			
Clinical consultation without admission during the last year			0.61
Yes	56 (65.9) †	118 (69.0) ‡	
Hospital admission since week-50			0.75
Yes	26 (31.3) §	57 (33.3) ‡	
Child ARV prophylaxis			0.27
Lamivudine	41 (47.7)	95 (54.9)	
Lopinavir/ritonavir	45 (52.3)	78 (45.1)	
Neuropsychological assessment			
SDQ-25; median [IQR]	6.0 [3.0;9.0] †	4.0 [2.0;8.0] †	0.02
TOVA; mean \pm SD	2.2 \pm 0.8 £	2.2 \pm 0.8 £	0.61

MABC-2 ; mean ± SD	78.2 ± 10.7 §	79.2 ± 10.6 €	0.75
KABC-II ; mean ± SD	48.9 ± 12.9 §	47.9 ± 12.5 ✕	0.59

† one missing value, ‡ two missing values, § three missing values, £ nine missing values, € four missing values, ✕ five missing values. ^a Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon signed-rank test or Student's *t*-test. Abbreviations: CHEU, children who are HIV-exposed uninfected; IQR, interquartile range; SD, standard deviation; WAZ, weight-for-age z-score; HAZ, height-for-age z-score; BMIZ, body mass index z-score; LDH, lactate dehydrogenase; ALT, alanine aminotransferase; ULN, under limit of normal; ARV, antiretroviral; SDQ-25, strength and difficulties questionnaire; TOVA, test of variable of attention; MABC-2, movement assessment battery for children - second edition; KABC-II, Kaufman assessment battery for children - second edition; NA non-applicable.

Supplementary Table S2. Overall dynamic of mtDNA content during the follow-up.

Follow-up time point	Group	PrEP	Burkina Faso		Uganda		All	
			<i>n</i>	Median MCN [IQR]	<i>n</i>	Median MCN [IQR]	<i>n</i>	Median MCN [IQR]
day-7	Baseline MCN	3TC	20	1014 [856;1415]	21	1083 [950;1145]	41	1083 [950;1145]
		LPV/r	23	1061 [938;1436]	22	1084 [992;1198]	45	1084 [992;1198]
		All	43	1053 [898;1436]	43	1083 [960;1180]	86	1082 [938;1253]
week-50	Increase of MCN from day-7	3TC	6	1604 [1172;2093]	10	1235 [1101;1792]	16	1260 [1123;1876]
		LPV/r	8	1416 [1073;1684]	11	1319 [1098;1763]	19	1319 [1098;1729]
		All	14	1416 [1101;1776]	21	1261 [1101;1763]	35	1300 [1100;1776]
	Decrease of MCN from day-7	3TC	14	795 [657;918]	11	470 [365;628]	25	657 [436;855]
		LPV/r	15	793 [622;986]	11	770 [6337;972]	26	781 [637;972]
		All	29	793 [655;918]	22	632 [436;813]	51	742 [550;888]
year-6	Increase of MCN from week-50	3TC	7	957 [642;1294]	12	994 [822;1168]	19	957 [808;1183]
		LPV/r	13	1279 [1091;1526]	11	965 [869;1182]	24	1099 [913;1459]
		All	20	1124 [872;1430]	23	965 [836;1182]	43	1027 [869;1385]
	Decrease of MCN from week-50	3TC	13	789 [617;904]	9	1133 [976;1194]	22	891 [623;1157]
		LPV/r	10	793 [665;945]	11	900 [771;1280]	21	867 [720;997]
		All	23	789 [647;945]	20	1014 [792;1237]	43	877 [689;1132]

Abbreviations: mtDNA, mitochondrial DNA; PrEP, pre-exposure prophylaxis; MCN, mitochondrial DNA copy number per cell; IQR, interquartile range; 3TC, lamivudine; LPV/r, lopinavir/ritonavir.

Supplementary Table S3. Characteristics at week-50 of the CHEU with depletion between the PROMISE PEP and the PROMISE M&S trials.

Characteristic	CHEU with depletion M&S (n = 17)	CHEU with depletion PEP (n = 28)	p Value ^a
Socio-demographics; n (%)			
Site			0.67
Burkina Faso	9 (52.9)	13 (46.4)	
Uganda	8 (47.1)	15 (53.6)	
Gender			0.37
Male	8 (47.06)	17 (60.7)	
Anthropometrics			
Weight (kg); mean ± SD	8.1 ± 1.1	8.3 ± 1.1	0.52
Height (cm); mean ± SD	73.2 ± 3.9	72.9 ± 4.1	0.83
WAZ ; mean ± SD	-1.4 ± 1.3	-1.2 ± 1.3	0.76
HAZ ; mean ± SD	-0.9 ± 1.2	-1.1 ± 1.3	0.56
WHZ ; mean ± SD	-1.2 ± 1.3	-0.91 ± 1.2	0.42
Underweight (WAZ<2); n (%)	6 (35.3)	8 (28.6)	0.74
Stunting (HAZ<2); n (%)	3 (17.7)	7 (25.0)	0.72
Wasting (WHZ<2); n (%)	4 (23.5)	5 (17.9)	0.71
Gestational age (weeks); mean ± SD	39.4 ± 2.0	38.7 ± 1.8	0.21
Preterm birth (weeks); n (%)			0.69
No prematurity ≥ 37	15 (88.2)	22 (78.6)	
Prematurity < 37	2 (11.8)	6 (21.4)	
Hematology ^b			
Hemoglobin concentration (g/dL); mean ± SD	9.6 ± 1.2 †	9.9 ± 1.1 ‡	0.34
Hemoglobin concentration (g/dL); n (%)			0.75
Normal >10.9	1 (6.7) †	4 (16.0) ‡	
Anemia ≤10.9	14 (93.3) †	21 (84.0) ‡	
Mild [10.0-10.9[6 (40.0) †	12 (48.0) ‡	
Moderate [9.0-10.0[5 (33.3) †	5 (20.0) ‡	
Severe [7.0-9.0[3 (20.0) †	4 (16.0) ‡	
Platelet count (10 ³ /mm ³); mean ± SD	422.3 ± 203.1 †	354.4 ± 169.4 ‡	0.26
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)			1.00
Normal >125	13 (86.7) †	22 (88.0) ‡	
Thrombocytopenia ≥ 125	2 (13.3) †	3 (12.0) ‡	
Mild [125-100[1 (6.7) †	1 (4.0) ‡	
Moderate [100-50[1 (6.7) †	2 (8.0) ‡	
Leucocyte count (10 ³ /mm ³); n (%)			NA
Normal >2.5	15 (100.0) †	25 (100.0) ‡	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)			1.00
Normal >1.3	14 (93.3) †	21 (84.0) ‡	
Neutropenia ≤1.3	1 (6.7) †	4 (16.0) ‡	
Mild [1.0-1.3[1 (6.7) †	1 (4.0) ‡	
Moderate [0.75;1.0[-	1 (4.0) ‡	
Severe [0.5;0.75[-	1 (4.0) ‡	

Very severe <0.5	-	1 (4.0) ‡	
Biochemistry ^b ; <i>n</i> (%)			
ALT concentration (ULN)			0.62
Normal < 1.25xULN	12 (85.7) ‡	22 (91.7) §	
Abnormal ≥ 1.25xULN	2 (14.3) ‡	2 (8.3) §	
Mild [1.25-2.5]xULN	2 (14.3) ‡	2 (8.3) §	
Medical events ; <i>n</i> (%)			
Child ARV prophylaxis			0.62
Lamivudine	11 (64.7)	16 (57.1)	
Lopinavir/ritonavir	6 (35.3)	12 (42.9)	

[†] two missing values, [‡] three missing values, [§] four missing values. ^a Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Student's *t*-test. ^b Data was at week 38 postpartum because few data were available at week-50 for hematological and biochemical parameters. Abbreviations: CHEU, children who are HIV-exposed uninfected; IQR, interquartile range; SD, standard deviation; WAZ, weight-for-age z-score; HAZ, height-for-age z-score; WHZ, weight-for-height z-score; ALT, alanine aminotransferase; ULN, under limit of normal; ARV, antiretroviral; NA non applicable.

Article 3

Supplementary Materials

1.1 Patients and Methods: Telomere length assay

Quantitative polymerase chain reaction efficiency, intra- and interplate coefficients of variation

Inter- and intra-plate coefficients of variation were calculated using Ct (n= 3 per plate) obtained after the DNA amplification of telomere and *RPLP0* regions of a controlled DNA from the Human Embryonic Kidney 293T cell line.

Intra-plate coefficient of variation of telomere length, defined by $\Delta TL/TL_{intra}$, was calculated for each plate with the following formula:

$$\Delta TL/TL_{intra} = \frac{\text{Standard deviation Ct(Telomere)}}{\text{mean Ct(Telomere)}} + \frac{\text{Standard deviation Ct(RPLP0)}}{\text{mean Ct(RPLP0)}}$$

$\Delta TL/TL_{intra}$ varied from 0.6% to 5.3%.

Inter-plate coefficient of variation, defined by $\Delta TL/TL_{inter}$, was calculated with the mean and the standard deviation of all $\Delta TL/TL_{intra}$. $\Delta TL/TL_{inter}$ was 4.03%.

Quality control of quantitative polymerase chain reaction and outliers identification

Twenty-one quantitative polymerase chain reaction plates were necessary to quantify telomere length of the full children population (n=238, Supplementary Figure S1). As a quality control, all plates with a quantitative polymerase chain reaction efficiency outside the range of the mean of efficiency of all plates ± 2 standard deviation (SD) were repeated. Efficiency for telomere had a mean of 70.8% ± 7.6 and efficiency for *RPLP0* had a mean of 107.0% ± 4.4 . We also checked for nuclear DNA degradation by removing samples with a cycle threshold (Ct) for *RPLP0* not comprised between the mean of all the *RPLP0* Ct $\pm 2SD$. Samples with a Ct for telomere not comprised between the mean of all the telomere Ct $\pm 2SD$ was considered as outliers and removed from the analysis. The flow chart of the study and the quality control assessment were depicted in Supplementary Figure S1.

1.2 Results: Quality control of DNA and outliers identification

All quantitative polymerase chain reaction plates fulfilled the quality control rule. In the PrEP group, thirty-one CHEU failed the quality control after checking for *RPLP0* and Tel DNA degradation at day-7, week-50 and year-6. In the sub-analysis, two CHEU were also removed after checking for DNA degradation at week-6 and week-50.

Supplementary Figures and Tables

Supplementary Figures

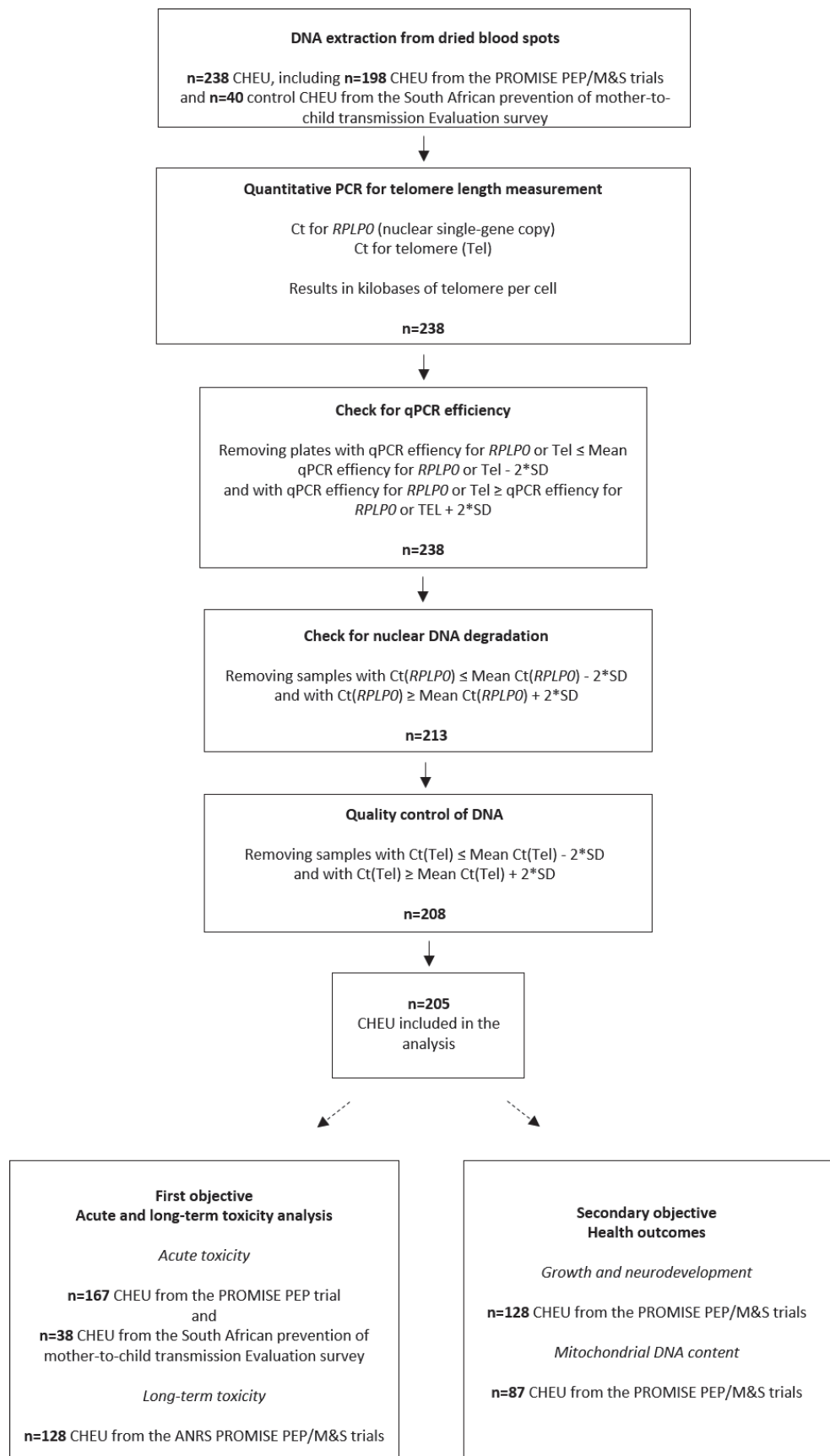


Figure S1. Analysis flow for telomere length measurement. Abbreviations: CHEU, children who are HIV-exposed uninfected; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR; Ct, cycle threshold.

Supplementary Tables

Supplementary Table S1. Oligomers and primers used for telomere length measurement by quantitative polymerase chain reaction

		Sequence	Amplicon size
Standards (synthetic oligomers)	Telomere	(TTAGGG) ₁₄	84pb
	<i>RPLP0</i>	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCCGTCT CCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTGT ACCCGTTGATGATAGAATGGG	75pb
Primers	Forward Telomere	CGGTTTGTGGGTTTGGGTTTGGGTTT GGGTTTGGGTT	>76pb
	Reverse Telomere	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTT ACCCTTACCCT	
	Forward <i>RPLP0</i>	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	75pb
	Reverse <i>RPLP0</i>	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	

Supplementary Table S2. Characteristics of CHEU analyzed in the study versus CHEU not selected, at randomisation (day-7)

Characteristics	CHEU analyzed (n=167)	CHEU not selected (n=1098)	p value ^a
<i>Socio-demography</i>			
Site; n (%)			<0.01
Burkina Faso	44 (26.3)	160 (14.6)	
South Africa	39 (23.4)	181 (16.5)	
Uganda	43 (25.7)	235 (21.4)	
Zambia	41 (24.6)	522 (47.5)	
Gender; n (%)			
Boy	84 (50.3)	573 (52.2)	0.65
<i>Anthropometry</i>			
Weight (kg); mean ± SD	3.3 ± 0.5 [†]	3.2 ± 0.5 [§]	0.12
Height (cm); mean ± SD	49.6 ± 2.0	49.3 ± 2.0 ^υ	0.06
WAZ; mean ± SD	-0.7 ± 1.3 [†]	-0.5 ± 1.0 [§]	0.10
HAZ; mean ± SD	-0.9 ± 1.1	-0.8 ± 1.0 ^υ	0.05
WHZ; mean ± SD	-0.4 ± 1.3 [‡]	-0.1 ± 1.2 ^ε	0.81
Underweight (WAZ<-2); n (%)	25 (15.4) [†]	73 (6.7) [§]	0.54
Stunting (HAZ<-2); n (%)	25 (15.3)	123 (11.3) ^υ	0.67
Wasting (WHZ<-2); n (%)	17 (10.6) [‡]	452 (4.9) ^ε	0.10
Gestational age (week); median [IQR]	38.0 [38.0;40.0]	38.0 [38.0;40.0]	0.19
Preterm birth (week); n (%)			0.05
No prematurity ≥37	148 (88.6)	907 (82.6)	
Prematurity <37	19 (11.4)	191 (17.4)	
<i>Hematology</i>			
Hæmoglobin (g/dL); mean ± SD	15.8 ± 2.1 [£]	15.9 ± 2.0 [§]	0.35
Haemoglobin (g/dL); n (%)			0.05
Normal >13	153 (92.2) [£]	1039 (94.6) [§]	
Anemia ≤13	13 (7.8) [£]	59 (5.4) [§]	
Mild [12;13]	10 (6.0) [£]	56 (5.1) [§]	
Moderate [10;12[2 (1.2) [£]	2 (0.2) [§]	
Severe [9;10[-	1 (0.1) [§]	
Very severe [0;9[1 (0.6) [£]	-	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)			0.01
Normal ≥125	152 (93.8) [‡]	1074 (98.0) [§]	
Thrombocytopenia <125	10 (6.2) [‡]	22 (2.0) [§]	
Mild [100;125[7 (4.3) [‡]	11 (1.0) [§]	
Moderate [50;100[1 (0.6) [‡]	6 (0.6) [§]	
Severe [25;50[1 (0.6) [‡]	4 (0.4) [§]	
Very severe [0;25[1 (0.6) [‡]	1 (0.1) [§]	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)			NA
Normal >2.5	166 (100.0) [£]	1097 (100.0) [§]	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)			
Normal >1.5	158 (96.3) [§]	1026 (94.4) [¶]	0.69

Neutropenia ≤ 1.5	6 (3.6) [§]	61 (5.6) [¶]
Mild [1.25;1.5]	4 (2.4) [§]	47 (4.3) [¶]
Moderate [1.0;1.25[2 (1.2) [§]	12 (1.1) [¶]
Severe [0.75;1.0[-	2 (0.2) [¶]

[†] one missing value, [§] three missing values, [°] ten missing values, [‡] four missing values, [£] two missing values, [¶] twelve missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Student's t-test or Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: SD, standard deviation; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; WAZ, weight-for-age Z-score; HAZ, height-for-age Z-score; WHZ, weight-for-height Z-score; NA non-applicable.

Supplementary Table S3. Children's characteristics at randomisation (day-7) for Burkina Faso

Characteristics	LPV/r (n=21)	3TC (n=23)	Total (n=44)	P value ^a
<i>Socio-demography</i>				
Gender; n (%)				0.55
Boy	11 (52.4)	10 (43.5)	21 (47.7)	
<i>Anthropometry</i>				
Weight (kg); mean ± SD	3.0 ± 0.4 [†]	3.1 ± 0.4	3.0 ± 0.4 [†]	0.52
Height (cm); mean ± SD	49.9 ± 1.7	49.6 ± 1.9	49.7 ± 1.8	0.62
WAZ; mean ± SD	-1.1 ± 0.9 [§]	-0.9 ± 1.0	-1.0 ± 1.0 [§]	0.63
HAZ; mean ± SD	-0.4 ± 0.9	-0.6 ± 0.8	-0.5 ± 0.8	0.44
WHZ; mean ± SD	-1.2 ± 0.9 [§]	-0.8 ± 1.1	-1.0 ± 1.0 [§]	0.31
Underweight (WAZ<-2); n (%)	4 (21.1) [§]	3 (13.0)	7 (16.7) [§]	0.68
Stunting (HAZ<-2); n (%)	1 (4.8)	2 (8.7)	3 (6.8)	1.00
Wasting (WHZ<-2); n (%)	4 (21.1) [§]	2 (8.7)	6 (14.3) [§]	0.38
Gestational age (week); median [IQR]	39.0 [37.0;40.0]	39.0 [37.0;41.0]	39.0 [37.0;41.0]	0.59
Preterm birth (week); n (%)				1.00
No prematurity ≥37	18 (85.7)	4 (17.4)	7 (15.9)	
Prematurity <37	3 (14.3)	19 (82.6)	37 (84.1)	
<i>Haematology</i>				
Hæmoglobin (g/dL); mean ± SD	15.3 ± 2.0	15.1 ± 2.0	15.2 ± 2.0	0.82
Haemoglobin (g/dL); n (%)				1.00
Normal >13	19 (90.5)	20 (87.0)	39 (88.6)	
Anemia ≤13	2 (9.5)	3 (13.0)	5 (11.4)	
Mild [12;13]	2 (9.5)	2 (8.7)	4 (9.1)	
Moderate [10;12[-	1 (4.4)	1 (2.3)	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal ≥125	21 (100.0)	23 (100.0)	44 (100.0)	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >2.5	21 (100.0)	23 (100.0)	44 (100.0)	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)				1.00
Normal >1.5	20 (95.2)	22 (95.7)	42 (95.5)	
Neutropenia ≤1.5	1 (4.8)	1 (4.4)	2 (4.6)	
Mild [1.25;1.5]	1 (4.8)	1 (4.4)	2 (4.6)	

[†] one missing value, [§] two missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test or Student's t-test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; SD, standard deviation; WAZ, weight-for-age Z-score; HAZ, height-for-age Z-score; WHZ, weight-for-height Z-score; IQR, interquartile range; NA non-applicable.

Supplementary Table S4. Children's characteristics at randomisation (day-7) for South Africa

Characteristics	LPV/r (n=13)	3TC (n=26)	Total (n=39)	P value ^a
<i>Socio-demography</i>				
Gender; n (%)				0.65
Boy	6 (46.2)	14 (53.9)	20 (51.3)	
<i>Anthropometry</i>				
Weight (kg); mean ± SD	3.2 ± 0.5	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.5	0.53
Height (cm); mean ± SD	48.5 ± 2.1	49.4 ± 1.7	49.1 ± 1.8	0.15
WAZ; mean ± SD	0.3 ± 1.1	0.03 ± 1.0	0.1 ± 1.0	0.51
HAZ; mean ± SD	-0.7 ± 1.1	-0.8 ± 1.0 [†]	-0.8 ± 1.0 [†]	0.66
WHZ; mean ± SD	0.8 ± 1.0	0.5 ± 1.1 [†]	0.6 ± 1.1 [†]	0.52
Underweight (WAZ<-2); n (%)	-	-	-	NA
Stunting (HAZ<-2); n (%)	1 (7.7)	2 (8.0) [†]	3 (7.9) [†]	1.00
Wasting (WHZ<-2); n (%)	-	1 (4) [†]	1 (2.63) [†]	1.00
Gestational age (week); median [IQR]	38.0 [37.0;38.0]	38.0 [38.0;38.0]	38.0 [38.0;38.0]	0.28
Preterm birth (week); n (%)				
No prematurity ≥37	11 (84.6)	23 (88.5)	34 (87.2)	1.00
Prematurity <37	2 (15.4)	3 (11.5)	5 (12.8)	
<i>Haematology</i>				
Hæmoglobin (g/dL); mean ± SD	16.6 ± 3.5	16.6 ± 2.9 [§]	16.6 ± 3.0 [§]	0.98
Haemoglobin (g/dL); n (%)				0.63
Normal >13	11 (84.6)	22 (91.7) [§]	33 (89.2) [§]	
Anemia ≤13	2 (15.4)	2 (8.3) [§]	4 (10.8) [§]	
Mild [12;13]	1 (7.7)	1 (4.2) [§]	2 (5.4) [§]	
Moderate [10;12[-	1 (4.2) [§]	1 (2.7) [§]	
Very severe [0;9[1 (7.7)	-	1 (2.7) [§]	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.21
Normal ≥125	9 (69.2)	20 (90.9) [‡]	29 (82.9) [‡]	
Thrombocytopenia <125	4 (30.8)	2 (9.1) [‡]	6 (17.1) [‡]	
Mild [100;125[2 (15.4)	2 (9.1) [‡]	4 (11.4) [‡]	
Moderate [50;100[1 (7.7)	-	1 (2.9) [‡]	
Very severe [0;25[1 (7.7)	-	1 (2.9) [‡]	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >2.5	13 (100)	24 (100.0) [§]	37 (100.0) [§]	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >2.5	13 (100)	24 (100.0) [§]	37 (100.0) [§]	

[†] one missing value, [§] two missing values, [‡] four missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test or Student's t-test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; SD, standard deviation; WAZ, weight-for-age Z-score; HAZ, height-for-age Z-score; WHZ, weight-for-height Z-score; IQR, interquartile range; NA non-applicable.

Supplementary Table S5. Children's characteristics at randomisation (day-7) for Uganda

Characteristics	LPV/r (n=20)	3TC (n=23)	Total (n=43)	p value ^a
<i>Socio-demography</i>				
Gender; n (%)				0.28
Boy	8 (40.0)	13 (56.5)	21 (48.8)	
<i>Anthropometry</i>				
Weight (kg); mean ± SD	3.4 ± 0.5	3.5 ± 0.5	3.5 ± 0.5	0.64
Height (cm); mean ± SD	50.0 ± 2.8	51.1 ± 1.6	50.6 ± 2.3	0.14
WAZ; mean ± SD	-0.6 ± 1.5 [†]	-0.6 ± 1.4	0.6 ± 1.4 [†]	0.98
HAZ; mean ± SD	-1.2 ± 1.2 [†]	-0.7 ± 1.4	-0.9 ± 1.3 [†]	0.21
WHZ; mean ± SD	0.04 ± 1.4 [†]	-0.3 ± 1.2	-0.2 ± 1.3 [†]	0.38
Underweight (WAZ<-2); n (%)	2 (10.5) [†]	4 (17.4)	6 (14.3) [†]	0.67
Stunting (HAZ<-2); n (%)	7 (36.8) [†]	4 (17.4)	11 (26.2) [†]	0.18
Wasting (WHZ<-2); n (%)	2 (10.53) [†]	1 (4.35)	3 (7.14) [†]	0.58
Gestational age (week); median [IQR]	38.0 [38.0;38.0]	38.0 [38.0;40.0]	40.0 [38.0;39.0]	0.46
Preterm birth (week); n (%)				NA
No prematurity ≥37	20 (100.0)	23 (100.0)	43 (100.0)	
<i>Haematology</i>				
Hæmoglobin (g/dL); mean ± SD	15.8 ± 1.3	15.8 ± 1.4	15.8 ± 1.3	0.91
Haemoglobin (g/dL); n (%)				NA
Normal >13	20 (100.0)	23 (100.0)	43 (100.0)	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.10
Normal ≥125	17 (85.0)	21 (95.5) [†]	38 (90.5) [†]	
Thrombocytopenia <125	3 (15.0)	1 (4.5) [†]	4 (9.5) [†]	
Mild [100;125[3 (15.0)	-	3 (7.1) [†]	
Severe [25;50[-	1 (4.5) [†]	1 (2.4) [†]	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >2.5	20 (100.0)	23 (100.0)	43 (100.0)	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.47
Normal >1.5	19 (95.0)	23 (100.0)	42 (97.7)	
Neutropenia ≤1.5	1 (5.0)	-	1 (2.3)	
Mild [1.25;1.5]	1 (5.0)	-	1 (2.3)	

[†] one missing value. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test or Student's t-test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; SD, standard deviation; WAZ, weight-for-age Z-score; HAZ, height-for-age Z-score; WHZ, weight-for-height Z-score; IQR, interquartile range; NA non-applicable.

Supplementary Table S6. Children's characteristics at randomisation (day-7) for Zambia

Characteristics	LPV/r (n=21)	3TC (n=20)	Total (n=41)	P value ^a
<i>Socio-demography</i>				
Gender; n (%)				0.87
Boy	11 (52.4)	11 (55.0)	22 (53.7)	
<i>Anthropometry</i>				
Weight (kg); mean ± SD	3.2 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.2 ± 0.4	0.78
Height (cm); mean ± SD	49.0 ± 1.6	48.6 ± 1.6	48.8 ± 1.6	0.49
WAZ; mean ± SD	-1.5 ± 1.1 [†]	-1.0 ± 1.3 [†]	-1.3 ± 1.2 [§]	0.16
HAZ; mean ± SD	-1.6 ± 1.1 [†]	-1.2 ± 0.9 [†]	-1.4 ± 1.1 [§]	0.24
WHZ; mean ± SD	-1.02 ± 1.2 [†]	-0.56 ± 1.5 [†]	-0.8 ± 1.3 [§]	0.29
Underweight (WAZ<-2); n (%)	7 (35.0) [†]	5 (26.3) [†]	12 (30.8) [§]	0.56
Stunting (HAZ<-2); n (%)	6 (30.0) [†]	2 (10.5) [†]	8 (20.5) [§]	0.24
Wasting (WHZ<-2); n (%)	4 (20.0) [†]	3 (15.8) [†]	7 (18.0) [§]	1.00
Gestational age (week); mean ± SD	38.0 ± 1.5	38.4 ± 1.3	38.2 ± 1.4	0.42
Preterm birth (week); n (%)				0.41
No prematurity ≥37	16 (76.2)	18 (90.0)	34 (82.9)	
Prematurity <37	5 (23.8)	2 (10.0)	7 (17.1)	
<i>Haematology</i>				
Hæmoglobin (g/dL); mean ± SD	15.6 ± 1.7	15.6 ± 2.1	15.6 ± 1.9	1.00
Haemoglobin (g/dL); n (%)				0.34
Normal >13	20 (95.2)	17 (85.0)	37 (90.2)	
Anemia ≤13	1 (4.8)	3 (15.0)	4 (9.8)	
Mild [12;13]	1 (4.8)	3 (15.0)	4 (9.8)	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal ≥125	21 (100.0)	20 (100.0)	41 (100.0)	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >2.5	21 (100.0)	20 (100.0)	41 (100.0)	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.49
Normal >1.5	19 (90.5)	18 (94.7) [†]	37 (92.5) [†]	
Neutropenia ≤1.5	2 (9.5)	1 (5.3) [†]	3 (7.5) [†]	
Mild [1.25;1.5]	-	1 (5.3) [†]	1 (2.5) [†]	
Moderate [1.0;1.25[2 (9.5)	-	2 (5.0) [†]	

[†] one missing value, [§] two missing values. ^aChi square test or Fisher's exact test as appropriate and Student's t-test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; SD, standard deviation; WAZ, weight-for-age Z-score; HAZ, height-for-age Z-score; WHZ, weight-for-height Z-score; IQR, interquartile range; NA non-applicable.

Supplementary Table S7. Maternal characteristics at randomisation (day-7) and during follow up of the PROMISE PEP trial for Burkina Faso

Characteristics	LPV/r (n=21)	3TC (n=23)	Total (n=44)	p value ^a
At randomisation (day-7)				
<i>Socio-demography</i>				
Age (year); median [IQR]	31.2 [27.3;35.3]	29.5 [20.9;32.6]	30.3 [25.1;33.7]	0.06
Parity; median [IQR]	3.0 [3.0;4.0]	2.0 [1.4;4.0]	3.0 [1.5;4.0]	0.09
<i>Education</i>				
Mother/caregiver ever attended school; n (%)				0.07
Yes	9 (42.9)	16 (69.6)	25 (56.8)	
<i>Economic status</i>				
Type of income; n (%)				0.75
No income generating activities	3 (14.3)	2 (8.7)	5 (11.4)	
Irregular income	13 (61.9)	13 (56.5)	26 (59.1)	
Regular income	5 (23.8)	8 (34.8)	13 (29.6)	
<i>Clinical and biological characteristics</i>				
BMI; median [IQR]	23.9 [21.2;26.1]	22.7 [21.4;24.4]	22.7 [21.2;25.9]	0.98
CD4 cells count (cells/mm ³); median [IQR]	507.0 [411.0;552.0]	502.0 [425.0;632.0]	504 [418.0;598.0]	0.46
HIV viral load control; n (%)				0.04
<1000 copies/mL	8 (38.1)	16 (69.6)	24 (54.5)	
≥1000 copies/mL	13 (61.9)	7 (30.4)	20 (45.5)	
WHO HIV staging; n (%)				0.60
Stage 1	19 (90.5)	22 (95.7)	41 (93.2)	
Stage 2	2 (9.5)	1 (4.3)	3 (6.8)	
<i>Maternal prophylaxis during pregnancy</i>				
ARV regimen; n (%)				1.00
ZDV	21 (100)	22 (95.7)	43 (97.7)	
No ARV	-	1 (4.3)	1 (2.3)	

Duration of ARV prophylaxis taken during pregnancy (week); median [IQR]	9.0 [8.0;12.0]	9.0 [5.0;11.0]	9.0 [6.0;11.0]	0.37
During the PROMISE PEP trial				
HIV viral load at week-38 (Log copies/mL); median [IQR]	4.8 [4.0;5.4] [†]	4.6 [3.4;4.9] [§]	4.7 [4.0;5.2] [‡]	0.44
HIV viral load control at week-38; n (%)				0.35
<1000 copies/mL	3 (16.7) [†]	1 (6.3) [§]	4 (11.8) [‡]	
≥1000 copies/mL	15 (83.3) [†]	15 (93.8) [§]	30 (88.2) [‡]	
Duration of breastfeeding (week); median [IQR]	46.6 [45.1;48.3]	47.7 [45.71;50.0]	47.0 [45.2;49.8]	0.20
Smoking during pregnancy; n (%)				NA
No	20 (100.0) [£]	21 (100.0) [°]	41 (100.0) [†]	
Smoking during breastfeeding; n (%)				NA
No	20 (100.0) [£]	21 (100.0) [°]	41 (100.0) [†]	
Alcohol consumption during pregnancy; n (%)				0.88
Yes	10 (50) [£]	10 (47.62) [°]	20 (48.78) [†]	

[†] three missing values, [§] seven missing values, [‡] ten missing values, [£] one missing value, [°] two missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; BMI, body mass index; HIV, Human immunodeficiency virus; WHO, World Health Organization; ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine.

Supplementary Table S8. Maternal characteristics at randomisation (day-7) and during follow up of the PROMISE PEP trial for South Africa

Characteristics	LPV/r (n=13)	3TC (n=26)	Total (n=39)	p value ^a
At randomisation (day-7)				
<i>Socio-demography</i>				
Age (year); median [IQR]	27.7 [27.0;33.8]	30.4 [25.7;34.7]	29.7 [25.7;34.4]	0.85
Parity; median [IQR]	2.0 [1.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	0.58
<i>Education</i>				
Mother/caregiver ever attended school; n (%)				NA
Yes	8 (100.0) [†]	17 (100.0) [§]	25 (100.0) [‡]	
<i>Economic status</i>				
Type of income; n (%)				0.16
Irregular income	4 (50.0) [†]	3 (17.6) [§]	7 (28.0) [‡]	
Regular income	4 (50.0) [†]	14 (82.4) [§]	18 (72.0) [‡]	
<i>Clinical and biological characteristics</i>				
BMI; median [IQR]	27.0 [24.2;28.0]	28.4 [23.2;33.7]	27.9 [23.9;32.3]	0.51
CD4 cells count (cells/mm ³); median [IQR]	504.0 [433.0;579.0]	455.5 [424.0;534.0]	458.0 [424.0;566.0]	0.34
HIV viral load control; n (%)				0.49
<1000 copies/mL	9 (69.2)	15 (57.7)	24 (61.5)	
≥1000 copies/mL	4 (30.8)	11 (42.3)	15 (38.5)	
WHO HIV staging; n (%)				NA
Stage 1	13 (100.0)	26 (100.0)	39 (100.0)	
<i>Maternal prophylaxis during pregnancy</i>				
ARV regimen; n (%)				NA
ZDV	13 (100.0)	26 (100.0)	39 (100.0)	
Duration of ARV prophylaxis taken during pregnancy (week); median [IQR]	11.0 [8.0;16.0]	14.0 [8.0;16.0]	12.0 [8.0;16.0]	0.98
During the PROMISE PEP trial				
HIV viral load at week-38 (Log copies/mL); median [IQR]	3.1 [2.4;3.5] [‡]	3.9 [2.9;4.5] [°]	3.5 [2.8;4.2] [†]	0.04

HIV viral load control at week-38; n (%)				0.71
<1000 copies/mL	5 (41.7) [£]	7 (31.8) [°]	12 (35.3) [†]	
≥1000 copies/mL	7 (58.3) [£]	15 (68.2) [°]	22 (64.7) [†]	
Duration of breastfeeding (week); median [IQR]	29.6 [11.7;45.3]	46.3 [34.0;49.9]	43.3 [30.3;49.0]	0.02
Smoking during pregnancy; n (%)				1.00
No	6 (85.7) [§]	13 (86.7) [¶]	19 (86.4) [‡]	
Smoking during breastfeeding; n (%)				1.00
No	6 (85.7) [§]	14 (93.3) [¶]	20 (90.9) [‡]	
Alcohol consumption during pregnancy; n (%)				1.00
Yes	3 (20.0) [§]	2 (28.6) [¶]	5 (22.7) [‡]	

† five missing values, § nine missing values, ‡ fourteen missing values, £ one missing value, ° four missing values, § six missing values, ¶ eleven missing values, ‡ seventeen missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; BMI, body mass index; HIV, Human immunodeficiency virus; WHO, World Health Organization; ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine.

Supplementary Table S9. Maternal characteristics at randomisation (day-7) and during follow up of the PROMISE PEP trial for Uganda

Characteristics	LPV/r (n=20)	3TC (n=23)	Total (n=43)	p value ^a
At randomisation (day-7)				
<i>Socio-demography</i>				
Age (year); median [IQR]	28.6 [24.4;31.0]	28.3 [24.2;30.2]	28.3 [24.2 30.2]	0.98
Parity; median [IQR]	3.5 [3.0;5.0]	3.0 [2.0;5.0]	3.0 [2.0;5.0]	0.74
<i>Education</i>				
Mother/caregiver ever attended school; n (%)				1.00
Yes	21 (91.3)	18 (90.0)	39 (90.7)	
<i>Economic status</i>				
Type of income; n (%)				0.91
No income generating activities	11 (55.0)	11 (47.8)	22 (51.2)	
Irregular income	3 (15.0)	3 (13.0)	6 (14.0)	
Regular income	6 (30.0)	9 (39.1)	15 (34.9)	
<i>Clinical and biological characteristics</i>				
BMI; median [IQR]	22.9 [21.8;24.5]	22.7 [20.2;24.2]	22.8 [21.1;24.4]	0.30
CD4 cells count (cells/mm ³); median [IQR]	513.5 [451.5;642.0]	530.0 [439.0;576.0]	523.0 [443.0;601.0]	0.79
HIV viral load control; n (%)				0.72
<1000 copies/mL	16 (80.0)	16 (72.7) [†]	32 (76.2) [†]	
≥1000 copies/mL	4 (20.0)	6 (27.3) [†]	10 (23.8) [†]	
WHO HIV staging; n (%)				0.24
Stage 1	20 (100.0)	20 (87.0)	40 (93.0)	
Stage 2	-	3 (13.04)	3 (7.0)	
<i>Maternal prophylaxis during pregnancy</i>				
ARV regimen; n (%)				0.11
ZDV	10 (50.0)	11 (47.8)	21 (48.8)	
AZT+3TC	5 (25.0)	11 (47.8)	16 (37.2)	
None	5 (25.0)	1 (4.3)	6 (14.0)	

Duration of ARV prophylaxis taken during pregnancy (week); median [IQR]	11.0 [6.0;12.0] [§]	6.5 [4.0;10.0] [†]	8.0 [4.0;12.0] [‡]	0.10
During the PROMISE PEP trial				
HIV viral load at week-38 (Log copies/mL); median [IQR]	2.6 [2.2;3.9] [£]	2.2 [2.2;3.9] [†]	2.2 [2.2;3.9] [§]	0.57
HIV viral load control at week-38; n (%)				0.26
<1000 copies/mL	9 (56.3) [£]	14 (63.6) [†]	23 (60.5) [§]	
≥1000 copies/mL	7 (43.8) [£]	8 (33.4) [†]	15 (39.5) [§]	
Duration of breastfeeding (week); median [IQR]	42.3 [37.4;45.4] [†]	38.9 [33.4;42.4]	40.3 [35.3;43.6]	0.28
Smoking during pregnancy; n (%)				NA
No	16 (100.0) [£]	21 (100.0) [°]	37 (100.0) [‡]	
Smoking during breastfeeding; n (%)				NA
No	16 (100.0) [£]	21 (100.0) [°]	37 (100.0) [‡]	
Alcohol consumption during pregnancy; n (%)				0.67
Yes	5 (31.3) [£]	8 (38.1) [°]	13 (35.1) [‡]	

[†] one missing value, [§] five missing values, [‡] six missing values, [£] four missing value, [°] two missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; BMI, body mass index; HIV, Human immunodeficiency virus; WHO, World Health Organization; ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine.

Supplementary Table S10. Maternal characteristics at randomisation (day-7) and during follow up of the PROMISE PEP trial for Zambia

Characteristics	LPV/r (n=21)	3TC (n=20)	Total (n=41)	p value ^a
At randomisation (day-7)				
<i>Socio-demography</i>				
Age (year); median [IQR]	28.8 [25.5;32.5]	27.9 [25.7;34.5]	28.7 [25.6;33.6]	0.67
Parity; median [IQR]	3.0 [2.0;4.0]	3.0 [3.0;4.0]	3.0 [2.0;4.0]	0.11
<i>Education</i>				
Mother/caregiver ever attended school; n (%)				NA
Yes	21 (100.0)	20 (100.0)	41 (100.0)	
<i>Economic status</i>				
Type of income; n (%)				1.00
No income generating activities	1 (4.8)	-	1 (2.4)	
Irregular income	16 (76.2)	15 (75.0)	31 (75.6)	
Regular income	4 (19.0)	5 (25.0)	9 (22.0)	
<i>Clinical and biological characteristics</i>				
BMI; median [IQR]	22.7 [21.6;25.2]	25.3 [23.23;28.0]	24.5 [21.7;26.5]	0.15
CD4 cells count (cells/mm ³); median [IQR]	467.0 [408.0;658.0]	484.5 [419.5;683.5]	477.0 [408.0;667.5]	0.81
HIV viral load control; n (%)				0.65
<1000 copies/mL	9 (42.9)	10 (50.0)	19 (46.3)	
≥1000 copies/mL	12 (57.1)	10 (50.0)	22 (53.7)	
WHO HIV staging; n (%)				NA
Stage 1	21 (100.0)	20 (100.0)	41 (100.0)	
<i>Maternal prophylaxis during pregnancy</i>				
ARV regimen; n (%)				NA
ZDV	21 (100.0)	20 (100.0)	41 (100.0)	
Duration of ARV prophylaxis taken during pregnancy (week); median [IQR]	8.0 [5.0;10.0]	8.0 [5.0;9.5]	8.0 [5.0;10.0]	0.51
During the PROMISE PEP trial				

HIV viral load at week-38 (Log copies/mL); median [IQR]	5.0 [3.6;5.2] [†]	4.4 [3.8;5.2] [§]	4.7 [3.7;5.2] [‡]	0.81
HIV viral load control at week-38; n (%)				0.45
<1000 copies/mL	3 (15.0) [†]	2 (12.5) [§]	5 (13.9) [‡]	
≥1000 copies/mL	17 (85.0) [†]	14 (87.5) [§]	31 (86.1) [‡]	
Duration of breastfeeding (week); median [IQR]	38.7 [37.0;44.1]	35.1 [32.1;41.3]	38.5 [33.7;41.6]	0.09
Smoking during pregnancy; n (%)				NA
No	20 (100.0) [†]	18 (100.0) [£]	38 (100.0) [°]	
Smoking during breastfeeding; n (%)				NA
No	20 (100.0) [†]	18 (100.0) [£]	38 (100.0) [°]	
Alcohol consumption during pregnancy; n (%)				0.39
Yes	7 (35.0) [†]	4 (22.2) [£]	11 (29.0) [°]	

[†] one missing value, [§] four missing values, [‡] five missing values, [£] two missing value, [°] three missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test for LPV/r versus 3TC. Abbreviations: LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range; BMI, body mass index; HIV, Human immunodeficiency virus; WHO, World Health Organization; ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine.

Supplementary Table S11. Children' telomere length at day-7 according to gender

Site	PrEP	n	Female median [IQR]	n	Male median [IQR]	p value ^a
Burkina Faso	Any	23	331 [131;459]	21	355 [214;467]	0.71
	LPV/r	10	262 [131;403]	11	355 [95;562]	0.60
	3TC	13	360 [307;482]	10	372 [231;459]	0.65
South Africa	Any	19	131 [109;147]	20	132 [119;162]	0.37
	LPV/r	7	117 [70;144]	6	125 [110;165]	0.20
	3TC	12	131 [112;147]	14	132 [116;147]	0.90
Uganda	Any	22	436 [332;485]	21	308 [268;410]	0.21
	LPV/r	12	473 [350;529]	8	331 [231;487]	0.28
	3TC	10	413 [226;447]	13	308 [276;410]	0.69
Zambia	Any	19	390 [368;485]	22	324 [208;367]	0.12
	LPV/r	10	330 [295;485]	11	331 [275;402]	0.70
	3TC	9	458 [268;464]	11	305 [105;346]	0.19
All	Any	83	322 [132;459]	84	272 [147;397]	0.33
	LPV/r	39	322 [178;483]	36	298 [150;407]	0.68
	3TC	44	319 [128;454]	48	258 [144;417]	0.52

^aWilcoxon Mann-Whitney test for Female versus Male. Abbreviations: PrEP, pre-exposure prophylaxis; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; IQR, interquartile range.

Supplementary Table S12. Description of children' and maternal characteristics in South Africa

Characteristics	Control group (n=37)	PrEP group (n=33)		p value ^a	
Children					
At week-6					
		LPV/r (n=12)	3TC (n=21)	Total (n=33)	
Gender; n (%)					0.99
Male	19 (51.4)			17 (51.5)	
Province of South Africa; n (%)					<0.01
Eastern Cape	6 (16.2)	12 (100.0)	21 (100.0)	33 (100.0)	
Others	31 (83.8)	-	-	-	
Weight (kg); mean ± SD	4.7 ± 1.1 [†]	4.7 ± 0.5 [§]	4.8 ± 0.6 [‡]	4.8 ± 0.6 [‡]	0.92
Height (cm); mean ± SD	52.5 ± 5.6 [‡]	53.6 ± 2.0 [§]	53.8 ± 1.9 [§]	53.7 ± 2.0 [‡]	0.53
Gestational age (week); mean ± SD	37.0 ± 3.1 [‡]	37.6 ± 0.8	37.8 ± 1.5	37.7 ± 1.3	0.33
Preterm birth (week); n (%)					0.07
No prematurity ≥37	14 (63.6) [‡]	10 (83.3)	18 (85.7)	28 (84.9)	
Prematurity <37	8 (36.4) [‡]	2 (16.7)	3 (14.3)	5 (15.2)	
Mother					
At week-6					
Age (year); median [IQR]	26.0 [22.0;30.0]	27.5 [24.7;32.6]	29.7 [25.7;32.4]	27.7 [25.7;32.4]	0.05
Parity; median [IQR]	2.0 [2.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	2.0 [1.0;3.0]	0.15
During the study					
Breastfeeding; n (%)					<0.01
Yes	22 (75.9) ^u	12 (100.0)	21 (100.0)	33 (100.0)	
Duration of breastfeeding; median; n (%)					0.55
<39 weeks	11 (37.9) ^u	8 (66.7)	7 (33.3)	15 (45.5)	
≥39 weeks	18 (62.1) ^u	4 (33.3)	14 (66.7)	18 (54.6)	

[†] five missing values, [§] one missing value, [‡] two missing values, [‡] twenty-seven missing values, [‡] fifteen missing values, ^u eight missing values. ^aWilcoxon Mann-Whitney test and Chi-square or Fisher's exact test for comparison between "Control group" (n = 37) and "PrEP group" (n = 33). Abbreviations: PrEP, pre-exposure prophylaxis; LPV/r, lopinavir/ritonavir; 3TC, lamivudine; SD, standard deviation; IQR, interquartile range.

Table S13. Characteristics of enrolled CHEU aged six years from the PROMISE M&S trial

Characteristic	LPV/r (n=62)	3TC (n=66)	Total (n=128)	p value ^a
<i>Socio-demography</i>				
Age (year); mean [IQR]	5.6 ± 0.6	5.7 ± 0.6	5.7 ± 0.6	0.21
Site; n (%)				0.90
Burkina Faso	21 (33.9)	23 (34.9)	44 (34.4)	
Uganda	20 (32.3)	23 (34.9)	43 (33.6)	
Zambia	21 (33.9)	20 (30.3)	41 (32.0)	
Gender; n (%)				
Male	29 (46.8)	33 (50.0)	62 (48.4)	0.72
<i>Anthropometry</i>				
Weight (kg); mean ± SD	19.3 ± 2.3 [†]	19.5 ± 2.9	19.4 ± 2.6 [†]	0.59
Height (cm); mean ± SD	114.5 ± 5.1 [†]	114.6 ± 6.4	114.6 ± 5.8 [†]	0.93
WAZ; mean ± SD	-0.6 ± 0.7 [†]	-0.6 ± 0.9	-0.6 ± 0.8 [†]	0.85
HAZ; mean ± SD	-0.4 ± 0.8 [†]	-0.5 ± 1.1	-0.4 ± 1.0 [†]	0.58
BMIZ; mean ± SD	-0.5 ± 0.9 [†]	-0.4 ± 0.8	-0.5 ± 0.8 [†]	0.50
<i>Hematology; n (%)</i>				
Haemoglobin concentration (g/dL)				0.85
Normal >10.4	58 (93.6)	62 (93.9)	120 (93.8)	
Anemia ≤10.4	4 (6.5)	4 (6.1)	8 (6.3)	
Mild [10.4-9.5[4 (6.5)	3 (4.6)	7 (5.5)	
Moderate [9.5-8.5[-	1 (1.5)	1 (0.8)	
Platelet count (10 ³ /mm ³)				NA
Normal >125	62 (100.0)	66 (100.0)	128 (100.0)	
Leucocyte count (10 ³ /mm ³)				NA
Normal >2.5	62 (100.0)	66 (100.0)	128 (100.0)	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³)				0.24
Normal >1.0	60 (93.8)	65 (100.0) [†]	125 (98.4) [†]	
Neutropenia ≤1.0	2 (3.2)	-	2 (1.6) [†]	
Mild [1.0-0.79[2 (3.2)	-	2 (1.6) [†]	
<i>Medical events; n (%)</i>				
Clinical consultation without admission during the last year				0.15
Yes	46 (75.4) [†]	42 (63.6)	88 (69.3) [†]	
Hospital admission since week-50				0.78
Yes	18 (30.0) [§]	18 (27.7) [†]	36 (28.8) [‡]	
<i>Neuropsychological assessment</i>				
SDQ-25; median [IQR]	7.0 [3.0;10.0] [†]	5.0 [4.0;10.0]	6.0 [3.0;10.0] [†]	0.53
TOVA; mean ± SD	2.1 ± 0.7	2.2 ± 0.8	2.2 ± 0.8 ^b	0.53
MABC-2; mean ± SD	78.5 ± 11.0	77.0 ± 10.5	77.7 ± 10.8 ^b	0.45

KABC-II; mean \pm SD 52.1 \pm 12.3 51.6 \pm 16.0 51.9 \pm 14.3^b 0.82

[†] one missing value, [§] two missing values, [‡] three missing values. ^aChi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Wilcoxon Mann-Whitney test or Student's t-test for LPV/r versus 3TC. ^bFor TOVA test, 119 CHEU had valid test (54 for LPV/r and 65 for 3TC); for MABC-2, 126 CHEU had valid test (60 for LPV/r and 66 for 3TC) and for KABC-II, 126 CHEU had valid test (61 for LPV/r and 65 for 3TC). Abbreviations: CHEU, children who are HIV-exposed uninfected; IQR, interquartile range; SD, standard deviation; WAZ, weight-for-age Z-score; HAZ, height-for-age Z-score; BMIZ, body mass index Z-score; NA, non-applicable; ARV, antiretroviral; SDQ-25, strength and difficulties questionnaire; TOVA, test of variable of attention; MABC-2, movement assessment battery for children second edition; KABC-II, Kaufman assessment battery for children second edition.

Table S14. Characteristics at week-50 of CHEU with or without telomere shortening at week-50

Characteristics	CHEU without telomere shortening (n=71)	CHEU with telomere shortening (n=57)	Total (n=128)	p value ^a
<i>Socio-demography</i>				
Site; n (%)				0.09
Burkina Faso	27 (38.0%)	17 (29.8%)	44 (34.4%)	
Uganda	18 (25.4%)	25 (43.9%)	43 (33.6%)	
Zambia	26 (36.6%)	15 (26.3%)	41 (32.0%)	
Gender; n (%)				0.59
Boy	37 (52.1)	27 (47.4)	64 (50.0)	
<i>Anthropometry</i>				
Weight (kg); mean ± SD	8.4 ± 1.1 [†]	8.5 ± 1.4 [†]	8.4 ± 1.2 [§]	0.65
Height (cm); mean ± SD	72.4 ± 2.7 [†]	72.3 ± 3.2 [‡]	72.4 ± 2.9 [£]	0.81
WAZ; mean ± SD	-0.96 ± 1.11 [†]	-0.91 ± 1.39 [£]	-0.94 ± 1.23 ^υ	0.83
HAZ; mean ± SD	-0.87 ± 1.07 [†]	-0.99 ± 1.15 [‡]	-0.92 ± 1.10 [£]	0.58
WHZ; mean ± SD	-0.71 ± 1.07 [†]	-0.57 ± 1.48 [£]	-0.64 ± 1.27 ^υ	0.56
Underweight (WAZ<-2); n (%)	14 (20.3%) [†]	11 (20.4%) [£]	25 (20.3%) ^υ	0.99
Stunting (HAZ<-2); n (%)	10 (14.5%) [†]	10 (17.9%) [‡]	20 (16.0%) [£]	0.61
Wasting (WHZ<-2); n (%)	7 (10.1%) [†]	9 (16.7%) [£]	16 (13.0%) ^υ	0.29
Gestational age (week); median [IQR]	38.0 [38.0-40.0]	40.0 [38.0-40.0]	39.0 [38.0-40.0]	<0.01
Preterm birth (week); n (%)				0.20
No prematurity ≥37	61 (85.9%)	53 (93.0%)	114 (89.1%)	
Prematurity <37	10 (14.1%)	4 (7.0%)	14 (10.9%)	
<i>Hematology</i>				
Hæmoglobin (g/dL); mean ± SD	10.0 ± 1.1 [§]	10.0 ± 1.1 [¥]	10.0 ± 1.1 [□]	0.70
Haemoglobin (g/dL); n (%)				0.92
Normal >13	12 (20.0%) [§]	9 (18.0%) [¥]	21 (19.1%) [□]	
Anemia ≤13	48 (80.0%) [§]	41 (82.0%) [¥]	89 (80.9%) [□]	
Mild [12;13]	21 (35.0%) [§]	18 (36.0%) [¥]	39 (35.5%) [□]	
Moderate [10;12[18 (30.0%) [§]	16 (32.0%) [¥]	34 (30.9%) [□]	
Severe [7;9[8 (13.3%) [§]	7 (14.0%) [¥]	15 (13.6%) [□]	
Very severe [0;9[1 (1.7%) [§]	-	1 (0.9%) [□]	
Platelet count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.73
Normal ≥125	59 (98.3%) [§]	48 (96%) [¥]	107 (97.3%) [□]	
Thrombocytopenia <125	1 (1.7%) [§]	2 (4.0%) [¥]	3 (2.7%) [□]	
Mild [100;125[1 (1.7%) [§]	1 (2.0%) [¥]	2 (1.8%) [□]	
Moderate [50;100[-	1 (2.0%) [¥]	1 (0.9%) [□]	
White cell count (10 ³ /mm ³); n (%)				NA
Normal >2.5	60 (100.0%) [§]	50 (100.0%) [¥]	110 (100.0%) [□]	
Neutrophil count (10 ³ /mm ³); n (%)				0.73
Normal >1.5	48 (80.0%) [§]	39 (78.0%) [¥]	87 (79.1%) [□]	
Neutropenia ≤1.5	12 (20.0%) [§]	11 (22.0%) [¥]	23 (20.9%) [□]	
Mild [1.25;1.5]	8 (13.3%) [§]	6 (12.0%) [¥]	14 (12.7%) [□]	
Moderate [1.0;1.25[2 (3.3%) [§]	4 (8.0%) [¥]	6 (5.5%) [□]	

Severe [0.75;1.0[2 (3.3%) ^g	1 (2.0%) ^h	3 (2.7%) ⁱ
<i>Other</i>			
Antiretroviral prophylaxis			0.62
Lamivudine	38 (46.5)	28 (49.1)	66 (51.6)
Lopinavir/ritonavir	33 (46.5)	29 (50.9)	62 (48.4)

[†] two missing values, [§] four missing values, [‡] one missing value, [£] three missing values, [̄] five missing values, ^q eleven missing values, [¥] seven missing values, [□] eighteen missing values. ^a Chi-square test or Fisher's exact test as appropriate and Student's t-test or Wilcoxon Mann-Whitney test for "CHEU with no TS" versus "CHEU with TS". Abbreviations: CHEU, children who are HIV-exposed uninfected; SD, standard deviation; WAZ, weight-for-age Z-score; HAZ, height-for-age Z-score; WHZ, weight-for-height Z-score; IQR, interquartile range; NA, non-applicable.

Résumé

L'universalisation des traitements antirétroviraux (ARV) couplée à l'augmentation de la couverture ARV chez les femmes enceintes et allaitantes infectées par le VIH voit l'émergence d'une population grandissante d'enfants non infectés nés de mères séropositives, exposés à la fois au VIH et aux ARV maternels de la conception à la petite enfance. Si l'impact de ces expositions questionne sur la santé de ces enfants et fait l'objet de maintes études, la prophylaxie ARV postnatale qui leur ait administrée dans le cadre de la prévention de la transmission mère-enfant (TME) du VIH nécessite elle aussi être rigoureusement évaluée, ces ARV restant donnés à des enfants non infectés. Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont consisté à évaluer la toxicité génomique aiguë et sur le long terme du lopinavir/ritonavir (LPV/r) ou de la lamivudine (3TC) utilisés en prophylaxie infantile pendant un an pour prévenir la TME du VIH par l'allaitement lors de l'essai PROMISE PEP mené dans quatre pays d'Afrique Sub-saharienne (Afrique du Sud, Burkina Faso, Ouganda et Zambie) entre novembre 2009 et mai 2012. Si cette prophylaxie étendue à toute la période de l'allaitement a montré son efficacité, avec des taux de transmission à un an de 1.4% et 1.5% pour le LPV/r et le 3TC respectivement, les recommandations actuelles de l'Organisation Mondiale de la Santé préconisent cependant une prophylaxie à base de névirapine (NVP) ou d'azidothymidine combinée à la NVP plafonnée à 12 semaines. Nos travaux indiquent que les deux prophylaxies se trouvaient associées à une prévalence importante d'enfants exposés non infectés présentant une déplétion de l'ADN mitochondrial (diminution du nombre de copies supérieure ou égale à 50% de la valeur initiale) au cours de la première année de vie. Ils ont également mis en évidence la présence d'ADN mitochondrial délétés chez la quasi-totalité des enfants dès l'initiation de la prophylaxie, démontrant ainsi une forte instabilité génomique. Toutefois, aucune association avec la croissance et le développement neuro-psychomoteur de ces enfants à 6 ans n'a été mise en évidence, alors que la déplétion ne persistait plus à cet âge-là et que les délétions sont irréversibles. Le raccourcissement de la longueur des télomères observé à un an n'a quant à lui montré aucune association avec les deux ARV et n'a eu aucun impact sur la santé des enfants à 6 ans. Ces travaux de thèse contribuent à l'évaluation globale de l'innocuité de la prophylaxie ARV utilisée chez les enfants exposés non infectés mais sont également d'intérêt pour ceux qui sont infectés et dont le traitement de première intention intègre le LPV/r et/ou le 3TC.

Mots clés : VIH, prophylaxie, allaitement, enfants exposés non infectés, Afrique Sub-Saharienne, lopinavir/ritonavir, lamivudine, ADN mitochondrial, télomères.

Abstract

The universalization of antiretroviral (ARV) treatment coupled with increased ARV coverage among HIV-infected pregnant and lactating women is contributing to an emerging population of uninfected children born to HIV-positive mothers, exposed to both maternal HIV and ARVs from conception to early childhood. If the impacts of these exposures on the health of these children is questionable and the subject of many studies, the post-natal ARV prophylaxis given to them as part of the prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) of HIV also needs to be rigorously evaluated, as these ARVs continue to be given to uninfected children. In this context, this thesis work consisted of evaluating the acute and long-term genomic toxicity of lopinavir/ritonavir (LPV/r) or lamivudine (3TC) used as infant prophylaxis for one year to prevent MTCT of HIV through breastfeeding in the PROMISE PEP trial conducted in four sub-Saharan African countries (South Africa, Burkina Faso, Uganda and Zambia) between November 2009 and May 2012. While this extended prophylaxis during the entire breastfeeding period has shown its efficacy, with transmission rates at one year of life of 1.4% and 1.5% for LPV/r and 3TC respectively, current World Health Organization guidelines recommend prophylaxis with nevirapine (NVP) or azidothymidine combined with NVP for a maximum of 12 weeks. Our work indicates that both prophylaxis regimens were associated with a significant prevalence of mitochondrial DNA depletion (decrease of mitochondrial copy number greater than or equal to 50% of the initial value) in the first year of life in children who are HIV-exposed uninfected. Our work also demonstrated the presence of deleted mitochondrial DNA in almost all children from the initiation of prophylaxis, thus indicating strong genomic instability. However, we found no association with the growth and neuropsychomotor development of these children at 6 years, at which point the depletion no longer persists and the deletions are irreversible. The shortening of telomere length observed at one year of age showed no association with the two ARVs and had no impact on the health of the children at 6 years. This thesis work contributes to the overall evaluation of the safety of ARV prophylaxis used in children who are HIV-exposed uninfected, but is also of interest to those who are infected and whose first-line treatment includes LPV/r and/or 3TC.

Keywords: HIV, prophylaxis, breastfeeding, HIV-exposed uninfected children, Sub-Saharan Africa, lopinavir/ritonavir, lamivudine, mitochondrial DNA, telomeres.