



**HAL**  
open science

# Développement d'un modèle murin de dénutrition avec entéropathie et évaluation de molécules d'intérêt permettant de contribuer au rétablissement de la fonction de barrière intestinale

Emmeline Salameh

## ► To cite this version:

Emmeline Salameh. Développement d'un modèle murin de dénutrition avec entéropathie et évaluation de molécules d'intérêt permettant de contribuer au rétablissement de la fonction de barrière intestinale. Hépatologie et Gastroentérologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR064 . tel-03353308

**HAL Id: tel-03353308**

**<https://theses.hal.science/tel-03353308>**

Submitted on 24 Sep 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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité** Science de la Vie et de la Santé

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

**Développement d'un modèle murin de dénutrition avec entéropathie et évaluation de molécules d'intérêt permettant de contribuer au rétablissement de la fonction de barrière intestinale**

**Présentée et soutenue par  
Emmeline SALAMEH**

**Thèse soutenue publiquement le 17 Septembre  
devant le jury composé de**

M. Régis Hankard	PU-PH - INSERM UMR 1069 – Université de Tours	Rapporteur
Mme. Gaëlle Boudry	CR – Institut NumCan – INRA – Saint-Gilles	Rapporteur
Mme. Claire Cherbuy	IGR – Institut Micalis – INRA – Jouys-en-Josas	Examineur
Mme Isabelle Dubus	PU – INSERM UMR 1234 – Université de Rouen Normandie	Examineur
Mme. Rachel Marion-Letellier	MCF – INSERM UMR 1073 – Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse
M. Pierre Déchelotte	PU-PH – INSERM UMR 1073 – Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par le Pr Pierre Déchelotte et co-encadrée par le Dr Rachel Marion-Letellier – INSERM UMR 1073 « Nutrition, inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau »**

Confidentiel



*« La santé est la qualité la plus méritoire du corps. »  
Aristote ; Rhétorique, I, 5, 15 - IV<sup>e</sup> s. av. J.-C.*

## Remerciements

J'aimerais remercier Pr Pierre Déchelotte, en tant que directeur de thèse et directeur du laboratoire de m'avoir accueillie et de m'avoir confié ce projet de thèse. Je remercie également chaleureusement le Dr Rachel Marion-Letellier en tant que co-directrice de thèse, pour son aide précieuse, sa bienveillance et son écoute. Grâce à elle j'ai pu donner le meilleur de moi-même.

Je souhaite remercier amicalement Mamane Zeilani et Fanny Morel de la société Nutriset. Notre collaboration m'a permis de découvrir la recherche sous un autre angle et ainsi mieux comprendre la recherche en entreprise.

Je souhaiterais remercier également Dr Gaëlle Boudry et Pr Régis Hankard de m'avoir fait l'honneur d'être mes rapporteurs de thèse. Je remercie Dr Claire Cherbuy ainsi que Pr Isabelle Dubus d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinatrices.

Merci aux Dr François Blachier, Muriel Thomas, Benjamin Bertin, Marie-Pascale Prudhomme et Aline Planchon d'avoir fait partie de mon comité de suivi individuel durant cette thèse.

Marine, merci de ton aide précieuse durant ces travaux de thèse. Merci d'avoir été là durant les moments difficiles, les sorties nocturnes au laboratoire et les arrivées aux aurores. Une grande amitié s'est formée grâce à ça. La team « Nutriset » du laboratoire ne serait rien sans elle.

Je remercie Clément dont les blagues incisives vont me manquer et son directeur de thèse Moïse Coëffier pour ses conseils avisés.

Merci à Zoé Racine, ma stagiaire de Master 1 et 2 qui a énormément participé à ce projet de thèse. Merci pour ton dévouement, ta motivation et ton aide précieuse.

Je remercie également Pascale de Saint Priest, Marine Le Chatelier et Mouhamed Barro de m'avoir intégré au sein du département RESN. J'aimerais également dire merci à Maxime Bohin, responsable produit chez Nutriset, pour son aide.

Je remercie également Dr David Ribet pour son expertise, sa bonne humeur et ses gâteaux.

Merci également à tout le personnel technique, Christine, Charlène et Alexis. Merci pour votre gentillesse et votre aide pour ces années. Je remercie également Gaëlle, en alternance depuis peu au laboratoire.

Merci à tous les doctorants du laboratoire, Manon, Marie, Pauline, Asma, Chaima et Wafa pour leur soutien et également leur bonne humeur. Merci à Karim, Nicolas, Romain, Séverine et Jonathan, qui ont passé leur thèse depuis longtemps, mais qui ont énormément contribué à la bonne ambiance du laboratoire.

J'aimerais également remercier Saïda, Alice et Camille pour leur gentillesse et leur sourire.

Muchas Gracias à Liliana, pour ta gentillesse et ton énergie et merci à Sylvie et Sabine, mes assistantes de direction favorites !!

J'aimerais remercier mes parents, de m'avoir soutenu durant toutes ces années de faculté. Merci à ma sœur Sanna, à Léonie et à Jean de me faire rire juste le temps d'un week-end. La famille, il n'y a que ça de vrai.

Et je remercie Quentin, de m'avoir encouragée durant cette dernière année de thèse. Et ça c'est un exploit ! L'avenir nous appartient !

## Table des matières

<b>Abbréviations.....</b>	<b>6</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>Préambule.....</b>	<b>9</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>10</b>
<b>Chapitre 1 - Introduction .....</b>	<b>13</b>
1. <i>Organisation de la barrière intestinale .....</i>	<i>13</i>
1.1. Le système immunitaire inné .....	13
1.2. Le système immunitaire adaptatif .....	17
1.3. Le microbiote intestinal.....	19
2. <i>La malnutrition.....</i>	<i>25</i>
2.1. Définitions, prévalence et épidémiologie de la malnutrition aiguë et chronique .....	25
2.2. Les causes de la malnutrition aiguë .....	25
2.3. Protocole de prise en charge de la MA .....	27
2.4. Conséquences et mécanismes physiopathologiques de la malnutrition .....	29
3. <i>La Dysfonction Entérique Environnementale .....</i>	<i>37</i>
3.1. Caractéristiques de la dysfonction entérique environnementale.....	37
3.2. Étiologie de la dysfonction entérique environnementale .....	37
3.3. Prévalence et épidémiologie .....	37
3.4. Causes de la DEE et mécanismes physiopathologiques .....	38
3.5. Conséquences de la DEE .....	40
3.6. Les biomarqueurs de la dysfonction entérique environnementale .....	42
4. <i>Les modèles de dénutrition avec entéropathie .....</i>	<i>47</i>
5. <i>Effets des nutriments sur la fonction de barrière intestinale .....</i>	<i>49</i>
5.1. La glutamine .....	49
5.2. La leucine.....	51
5.3. La gomme arabique.....	53
5.4. Le sélénium .....	57
<b>Chapitre 2 – Travaux de thèse .....</b>	<b>61</b>
1. <i>Justification .....</i>	<i>61</i>

2. Objectifs de la thèse .....	61
<b>Objectif 1</b> : Développement d'un modèle murin de dénutrition avec entéropathie .....	61
<b>Objectif 2</b> : Évaluation de laits thérapeutiques supplémentés en nutriments d'intérêts sur la croissance et la fonction de barrière intestinale .....	62
Revue n°1 .....	63
Article n°1 .....	105
Article n°2 .....	141
Article n°3 .....	159
<b>Chapitre 3 - Discussion générale et perspectives .....</b>	<b>193</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>209</b>
<b>Références .....</b>	<b>211</b>
<b>Valorisation des travaux de thèse .....</b>	<b>241</b>
<b>Annexes – Valorisation des travaux de Master 2.....</b>	<b>243</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : La barrière intestinale.....	<b>13</b>
<b>Figure 2</b> : Schéma de la barrière intestinale.....	<b>14</b>
<b>Figure 3</b> : Les récepteurs de l'immunité innée.....	<b>15</b>
<b>Figure 4</b> : Coupe distale de colon de souris.....	<b>16</b>
<b>Figure 5</b> : Pourcentage d'enfants âgés de moins de 5 ans atteints de malnutrition aiguë sévère dans le monde.....	<b>21</b>
<b>Figure 6</b> : Les causes de la dénutrition dans les pays à faibles revenus et à revenus intermédiaires.....	<b>22</b>
<b>Figure 7</b> : Critères de diagnostic et protocole de prise en charge nutritionnelle de la malnutrition aiguë.....	<b>23</b>
<b>Figure 8</b> : Les conséquences de la malnutrition aiguë sévère.....	<b>24</b>
<b>Figure 9</b> : La dysfonction entérique environnementale.....	<b>28</b>
<b>Figure 10</b> : Hypothèse du cercle vicieux.....	<b>33</b>
<b>Figure 11</b> : Effets de la glutamine sur la fonction de barrière intestinale.....	<b>38</b>
<b>Figure 12</b> : Schéma résumant l'effet de la gomme arabique sur la fonction de barrière intestinale.....	<b>44</b>
<b>Figure 13</b> : Effet du sélénium l'amélioration des paramètres inflammatoires de l'intestin.....	<b>45</b>



## Abbréviations

<b><math>\alpha</math>1AT</b> : $\alpha$ -1-anti-trypsin	<b>MICI</b> : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
<b>4-EBP1</b> : Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-Binding Protein 1	<b>MPO</b> : Myélopéroxydase
<b>AGCC</b> : Acide Gras à Chaîne Courte	<b>mTOR</b> : Mechanistic Target of Tapamycin
<b>AgRP</b> : Agouti-Related Protein	<b>MUAC</b> : Middle Upper Arm Circumference
<b>BCAA</b> : Branched Chain Amino Acid	<b>MUC-2</b> : Mucine-2
<b>COX</b> : Cyclooxygénase	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b> : Nuclear Factor-kappa B
<b>CPAg</b> : Cellules Présentatrices d'Antigène	<b>NLR</b> : NOD-Like Receptors
<b>CTLR</b> : C-type Lectin-like receptors	<b>NPY</b> : Neuropeptide Y
<b>DEE</b> : Dysfonction Entérique Environnementale	<b>OMS</b> : Organisation Mondiale de la Santé
<b>DHA</b> : Acide Docosahéxaénoïque	<b>PAMP</b> : Pathogen Associated Molecular Pattern
<b>DSS</b> Dextran Sulphate Sodium	<b>PB</b> : Périmètre brachial
<b>ETEC</b> : E. coli entérotoxique	<b>POMC</b> : Pro-opiomélanocortine
<b>GA</b> : Gomme Arabique	<b>ProANP</b> : Pro-Atrial Natriuretic Peptide
<b>Gln</b> : Glutamine	<b>PRR</b> : Pathogen Recognition Receptor
<b>IFN</b> : Interféron	<b>RLR</b> : Retinoid acid-inducible gene-1-Like Receptors
<b>Ig</b> : Immunoglobuline	<b>ROS</b> : Reactive Oxygen species
<b>IL</b> : Interleukine	<b>RUSF</b> : Ready-to-Use-Supplementary-Food
<b>iNOS</b> : inducible Nitric Oxide Synthase	<b>RUTF</b> : Ready-to-Use-Therapeutic-Food
<b>JNK</b> : c-Jun N-terminal Kinase	<b>Se</b> : Sélénium
<b>LPS</b> : Lipopolysaccharides	<b>SK</b> : Syndrome de kwashiorkor
<b>MA</b> : Malnutrition Aiguë	<b>TFF-3</b> : Trefoil Factor 3
<b>MAL-ED</b> : Malnutrition and Early Disease	<b>TGF</b> : Tumor Growth Factor
<b>MAM</b> : Malnutrition aiguë modérée	<b>TLR</b> : Toll Like Receptor
<b>MAS</b> : Malnutrition Aiguë Sévère	<b>TNBS</b> : acide Trinitrobenzènesulfonique
<b>MC</b> : Malnutrition Chronique	<b>TNF</b> : Tumor Necrosis Factor
<b>MCP-1</b> : Monocyte Chemoattractant Protein 1	<b>ZO-1</b> : Zonula-Occludens 1

### **Développement d'un modèle murin de dénutrition avec entéropathie et évaluation de molécules d'intérêt permettant de contribuer au rétablissement de la fonction de barrière intestinale**

**Contexte :** La malnutrition aiguë sévère (MAS) est un problème majeur de santé publique dans le monde et affecte 17 millions d'enfants âgés de moins de 5 ans. La MAS induit une perte de poids rapide, souvent associée à une dysfonction entérique environnementale (DEE). La DEE se caractérise par une augmentation de l'inflammation, de la perméabilité intestinale, une diminution de la taille des villosités et de l'absorption des nutriments. La DEE peut ainsi limiter l'efficacité des protocoles de stabilisation et de re-nutrition chez l'enfant dénutri.

**L'objectif** de cette thèse a été de développer un modèle de dénutrition avec entéropathie pour évaluer des laits thérapeutiques enrichis en nutriments ciblant la fonction de barrière intestinale.

**Résultats :** Lors de la phase de développement du modèle, plusieurs approches ont été testées comme la restriction calorique, le régime hypoprotéiné, l'utilisation de lipopolysaccharides et de l'indométacine. Seule la combinaison d'un gavage quotidien d'indométacine pendant une semaine chez des souris dénutries par un régime pauvre en protéines a permis de développer un retard de croissance associé à une entéropathie. Suite à la validation de ce modèle, nous avons évalué la supplémentation du lait thérapeutique F-75 avec de la glutamine, de la leucine, de la gomme arabique et des levures sélénées. La glutamine et la leucine améliorent la fonction de barrière intestinale. Dans nos conditions expérimentales, l'enrichissement du lait thérapeutique avec la glutamine et la leucine combinés a eu des effets limités sur la fonction de barrière. La gomme arabique et les levures sélénées ont des propriétés prébiotiques et probiotiques et exercent des effets bénéfiques sur la barrière intestinale. L'enrichissement du lait thérapeutique avec l'association de ces deux composés permet d'inhiber l'inflammation intestinale et d'augmenter l'abondance de bactéries bénéfiques comme *Faecalibacterium prausnitzii*.

**Conclusion :** Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de développer un nouveau modèle de dénutrition avec entéropathie. Le lait thérapeutique enrichi en gomme arabique et levures sélénées exerce des effets bénéfiques sur la fonction de barrière intestinale dans notre modèle.

**Mots clefs :** Malnutrition aiguë sévère, dysfonction entérique environnementale, inflammation intestinale, perméabilité intestinale, stabilisation nutritionnelle.

### **Development of a murine model of undernutrition with enteropathy and effect of nutrients with beneficial effects on gut barrier function**

**Background :** Severe acute malnutrition (SAM) is a global health issue affecting 17 million children under the age of 5. SAM induces rapid weight loss and is often associated with environmental enteric dysfunction (EED). EED is characterized by intestinal hyperpermeability and inflammation, villus blunting and nutrient malabsorption. EED might, therefore, limit stabilization and re-nutrition protocol efficacy.

**Objectives :** This thesis aimed to develop an undernutrition model with enteropathy to evaluate the effect of a therapeutic milk enriched with nutrients on gut barrier function.

**Results :** During preclinical model development, several approaches were tested: calorie restriction, low-protein diet, use of lipopolysaccharides and indomethacin. Only daily indomethacin gavage during one week in protein-energy undernourished mice induced growth faltering associated with enteropathy. After preclinical model validation, we evaluated the effect of therapeutic milk supplemented with glutamine, leucine, gum arabic and/or selenium-enriched yeast on gut barrier function. Glutamine and leucine induce beneficial effects on gut barrier function. In our experimental conditions, therapeutic milk enriched with a combination of glutamine and leucine had a limited impact on this parameter. Gum arabic and selenium-enriched yeasts have prebiotic and probiotic properties on gut barrier function. Therapeutic milk supplemented with gum arabic and selenium-enriched yeast inhibited intestinal inflammation and enhanced specific bacteria abundance such as *Faecalibacterium prausnitzii*.

**Conclusion :** The studies conducted during this thesis permitted to develop a new model of undernutrition with enteropathy. Therapeutic milk enriched with arabic gum and selenium-enriched yeast triggered beneficial effects on gut barrier function in our preclinical model.

**Key words :** Severe acute malnutrition, environmental enteric dysfunction, intestinal inflammation, intestinal permeability, nutritional stabilization.

## Préambule

Le laboratoire INSERM UMR 1073 « Nutrition, inflammation et dysfonctionnement de l'axe intestin-cerveau » est dirigé par le Professeur Pierre Déchelotte. Les thématiques de recherche se concentrent sur la recherche de mécanismes et de nouvelles thérapies contre le syndrome de l'intestin irritable, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les troubles du comportement alimentaire et la dénutrition. Parmi ces thématiques, les mécanismes de l'inflammation intestinale, le rôle de l'axe intestin-cerveau sont les plus abordées et la modulation nutritionnelle et la neurostimulation sont les pistes thérapeutiques les plus étudiées.

Cette thèse est subventionnée par une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE). Ce projet est sous la direction du Pr Pierre Déchelotte et du Dr Rachel Marion-Letellier. Elle est également dirigée par Mamane Zeilani, en qualité de responsable scientifique, de la société Nutriset, spécialisée dans la formulation de solutions nutritionnelles contre toutes les formes de dénutrition (e.g. Malnutrition Aiguë ou Chronique).

La malnutrition aiguë (MA) est un problème majeur de santé publique dans le monde ayant une prévalence globale de 7,3% (1). 52 millions d'enfants sont touchés par cette forme de dénutrition dont 17 millions par la forme la plus sévère (1). La malnutrition aiguë sévère (MAS), ou marasme, se caractérise par (i) un rapport poids pour taille inférieur à -3 de l'écart-type, (ii) par un périmètre brachial (PB) inférieur à 115mm ou (iii) par la présence d'œdèmes bilatéraux (cas de Kwashiorkor) (2). La forme mixte associe le marasme et le syndrome de Kwashiorkor (2).

Les maladies infectieuses et/ou la diminution radicale de la consommation de macronutriments (glucides, lipides et protéines) et de micronutriments (vitamines et minéraux) sont les causes principales de la dénutrition infantile alors que les facteurs y contribuant sont (i) le manque d'accès à l'eau, (ii) un environnement contaminé, (iii) l'insécurité alimentaire, (iv) l'économie et (v) le manque d'accès aux soins. Les facteurs sous-jacents sont d'ordre social, culturel et politique.

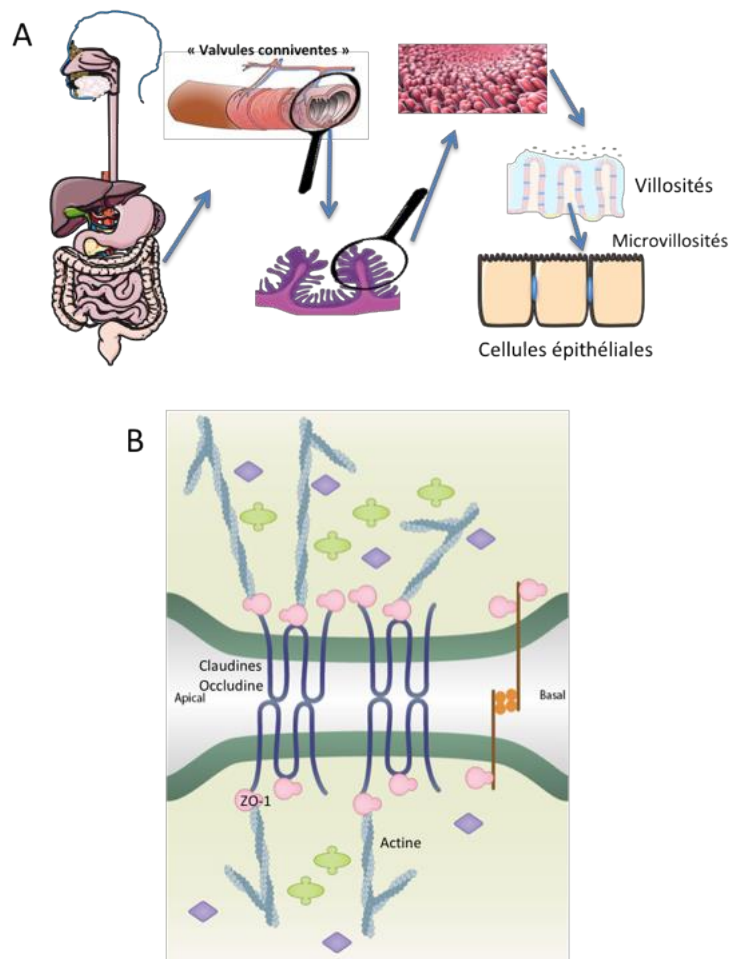
Dans les pays à faibles revenus et à revenus intermédiaires et plus particulièrement les zones contaminées, la dysfonction entérique environnementale (DEE) est ubiquitaire (3–6). La DEE est une dysfonction de la barrière intestinale caractérisée par : (i) une augmentation de la perméabilité et de l'inflammation intestinale, (ii) une diminution de la taille des villosités et (iii) une malabsorption des nutriments (7,8). Son étiologie est aujourd'hui non connue mais serait environnementale et impliquerait une exposition prolongée de microorganismes pathogènes menant soit à une dysbiose, soit à une infection entérique chronique. De plus, la DEE aggraverait l'état de dénutrition chez l'enfant l'entraînant alors dans un cercle vicieux. La DEE serait également un frein à la phase 1 de stabilisation dans le cadre de la MAS avec complications médicales (9,10).

Afin de mieux comprendre les mécanismes de la DEE, des modèles de dénutrition avec entéropathie ont été développés et sont décrits dans la littérature. Ces modèles associent la dénutrition à une infection entérale induite par un cocktail de bactéries (11) ou encore par *Cryptosporidium parvum* (12) ou *Giardia* (13). Cependant, l'inflammation induite par ces pathogènes ne modélise pas l'inflammation de bas grade que développent les enfants avec DEE, de plus, l'inflammation engendrée n'est pas contrôlée.

L'objectif de cette thèse a été de développer un modèle de dénutrition sévère avec DEE présentant un retard de croissance et une dysfonction de la barrière intestinale : une hyperperméabilité et une

inflammation intestinale. Une fois le modèle préclinique validé, nous avons testé plusieurs formulations de lait thérapeutique F-75 enrichi en nutriments d'intérêt ayant des effets bénéfiques sur les paramètres de fonctions de barrière et de croissance.

Avant d'introduire la malnutrition aiguë et la dysfonction entérique environnementale nous présenterons tout d'abord la fonction de barrière intestinale dans un contexte physiologique. Ensuite, nous définirons la malnutrition aiguë, sa prise en charge, ses causes et ses conséquences sur l'organisme de l'enfant. Suite à cela, nous définirons la dysfonction entérique environnementale, ubiquitaire dans les zones contaminées, et ses conséquences sur la fonction de barrière intestinale, l'état de dénutrition de l'enfant et son impact sur la réponse aux traitements. Afin d'étudier et de mieux comprendre la dysfonction entérique environnementale, des modèles précliniques sont décrits dans la littérature. Une revue de la littérature sur ces modèles a été rédigée et présentée dans la partie « résultats ». Enfin, un chapitre sur les nutriments d'intérêts ayant des effets bénéfiques sur la fonction de barrière intestinale a été rédigé. Dans le deuxième chapitre, les travaux effectués seront exposés sous formes d'articles (soumis ou en cours de préparation). Dans le dernier chapitre, les résultats obtenus ont été discutés au vu de la littérature actuelle et des perspectives de recherches ultérieures ont été évoquées.



**Figure 1: La barrière intestinale**

(A) L'intestin grêle se compose d'une muqueuse formant des replis transversaux appelés « valvules conniventes ». Sur chaque valvule, des villosités ainsi que des cryptes sont formées. Des cellules épithéliales tapissent cette structure. Les cellules épithéliales possèdent un grand nombre de microvillosités à leur pôle apical. Tous ces repliements permettent d'augmenter de 105 fois la surface intestinale. Les cellules épithéliales ont pour fonction d'absorber les nutriments et de défendre l'organisme contre les agressions de l'environnement extérieur. Cette protection est à la fois physique et chimique. (B) Les protéines de jonctions serrées se composent principalement des claudines, de l'occludine et de ZO-1. L'occludine et les claudines sont des protéines transmembranaires permettant de lier les cellules épithéliales entre elles. ZO-1 est une molécule cytoplasmique permettant de lier l'occludine et les claudines au cytosquelette composé principalement d'actine.

# Chapitre 1 - Introduction

## 1. Organisation de la barrière intestinale

Dans ce premier chapitre, nous allons présenter la fonction physiologique de barrière intestinale. La fonction de barrière intestinale est la capacité de la muqueuse intestinale d'assurer son rôle absorbant et de défense de l'organisme vis-à-vis des pathogènes pouvant être présents dans la lumière du tractus intestinal. Cette défense est possible grâce à l'épithélium intestinal et au système immunitaire intestinal comprenant une composante innée assurée par les cellules présentatrices de l'antigène, et une composante adaptative assurée par les lymphocytes. Le microbiote intestinal intervient également dans la fonction de la barrière intestinale.

### 1.1. Le système immunitaire inné

#### 1.1.1. L'épithélium intestinal

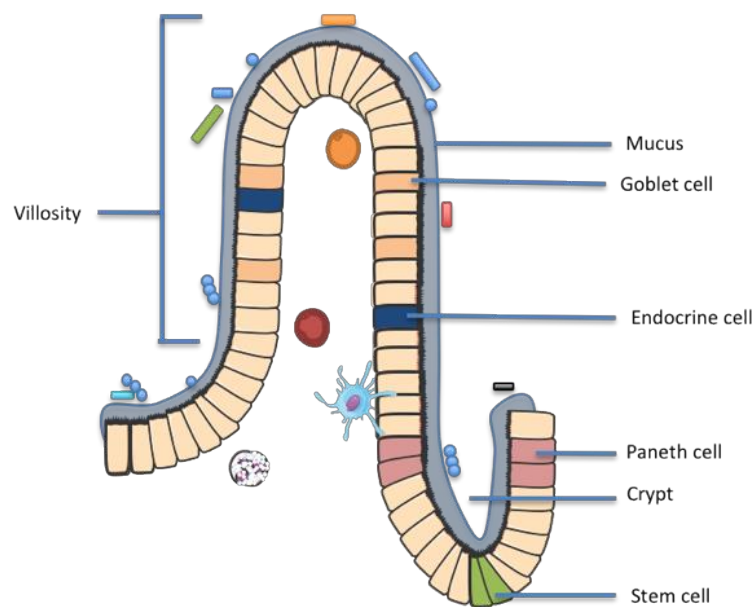
L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales qui constitue la première ligne de défense de l'intestin. Cette monocouche est organisée sous la forme de villosités et de cryptes. Cela permet d'offrir une surface d'échange et d'absorption des nutriments ainsi que des niches pour les cellules souches (Figure 1A). Il existe différents types de cellules épithéliales : (i) les entérocytes avec une fonction d'absorption, (ii) les cellules caliciformes productrices de mucus, (iii) les cellules de Paneth qui synthétisent des peptides antimicrobiens, (iv) des cellules entéro-endocrines et (v) des cellules souches au fond des cryptes permettant le renouvellement des cellules épithéliales tous les 2-3 jours (14). La fonction de barrière est assurée par des mécanismes physiques et chimiques.

#### La barrière physique de l'épithélium intestinal

La barrière physique est assurée par la monocouche de cellules épithéliales connectées par des jonctions intercellulaires assurées par les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions serrées (Figure 1B) permettent de contrôler la perméabilité paracellulaire des molécules. Les jonctions serrées comprennent différentes protéines : des protéines trans-membranaires comme les claudines ou l'occludine qui interagissent avec des protéines intracellulaires comme Zonula-Occludens 1 (ZO-1).

- a. **ZO-1** se positionne au niveau du cytoplasme et permet d'établir la liaison entre les jonctions serrées de la membrane et le cytosquelette en liant l'actine.





**Figure 2: Schéma de la barrière intestinale**

Plusieurs types de cellules composent la barrière épithéliale intestinale. Tout d'abord, les cellules souches se situent au fond des cryptes. Leur rôle est de renouveler l'épithélium intestinal en se multipliant et en se différenciant en plusieurs types cellulaires ayant des rôles bien définis. Parmi ces cellules, les cellules de Paneth, situées dans les cryptes, participent à la défense de l'organisme en sécrétant des molécules antimicrobiennes. Les cellules caliciformes sont des cellules productrices de mucus. Ce mucus tapisse les cellules épithéliales. Les cellules entéro-endocrines sont sécrétrices d'hormones (e.g. la somatostatine ou la motiline). La défense de cette barrière contre les pathogènes est exercée également par les cellules du système immunitaire situées dans la lamina propria. Le microbiote intestinal situé à la surface du mucus joue également ce rôle en limitant leur prolifération et en excréant des composés chimiques (bactériocines).

- b. **L'occludine** se situe entre la zone apicale et la zone basolatérale de la cellule épithéliale. Les souris invalidées pour le gène codant l'occludine présentent une augmentation importante de l'inflammation, une hyperplasie de l'épithélium gastrique et un retard de croissance sans impact sur la fonction de barrière (15).
- c. **La famille des claudines** comprend vingt-sept membres chez les mammifères. Les claudines peuvent jouer des rôles opposés. Par exemple, l'augmentation de l'expression protéique de la claudine-2 au niveau jéjunal est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale globale dans un modèle de dénutrition induite par un régime pauvre en protéines (7%)(11). Dans un modèle d'anorexie chez la souris, l'augmentation de la perméabilité colique est associée avec une diminution de l'expression protéique de claudine-1 dans le jéjunum (16).

Le mucus tapisse la paroi intestinale et assure également une barrière physique (Figure 2). Le mucus est un gel composé de mucines produit par les cellules caliciformes. L'épaisseur de ce mucus varie le long du tube digestif avec une épaisseur plus importante au niveau de l'iléon terminal et dans le colon. Cette entité est divisée en deux parties : (i) la couche interne directement en contact avec la partie apicale des cellules épithéliales et (ii) la couche externe en contact avec le microbiote intestinal (17). Alors que la couche interne contient des immunoglobulines A (IgA) et des peptides antimicrobiens, la couche externe est colonisée par des espèces commensales. La principale molécule composant le mucus est la mucine-2 codée par le gène MUC-2. La déficience de ce gène chez la souris induit une inflammation colique spontanée (18) sans impact sur l'iléon (19).

#### La barrière chimique de l'épithélium intestinal

Des molécules antimicrobiennes sont ainsi sécrétées et ces molécules permettent de détruire ou d'inhiber la croissance des microorganismes. Par exemple, les cellules de Paneth (Figure 2) situées au fond des cryptes produisent des  $\alpha$ -défensines, des lysosymes et de la phospholipase A2 (20). Ces molécules sont stockées dans des granules et libérées après la stimulation des cellules de Paneth par exemple par les bactéries présentes dans la lumière intestinale.

#### 1.1.2. Les cellules présentatrices d'antigène

La *lamina propria* comprend les cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) tels que les cellules dendritiques et les macrophages. Par exemple, les cellules dendritiques intestinales résidentes ont la capacité d'échantillonner des antigènes présents dans la lumière intestinale en étendant leurs dendrites entre les cellules épithéliales. Ces antigènes seront ensuite présentés aux lymphocytes faisant de ces CPAg des cellules intermédiaires entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Illustration : Carole Fumat

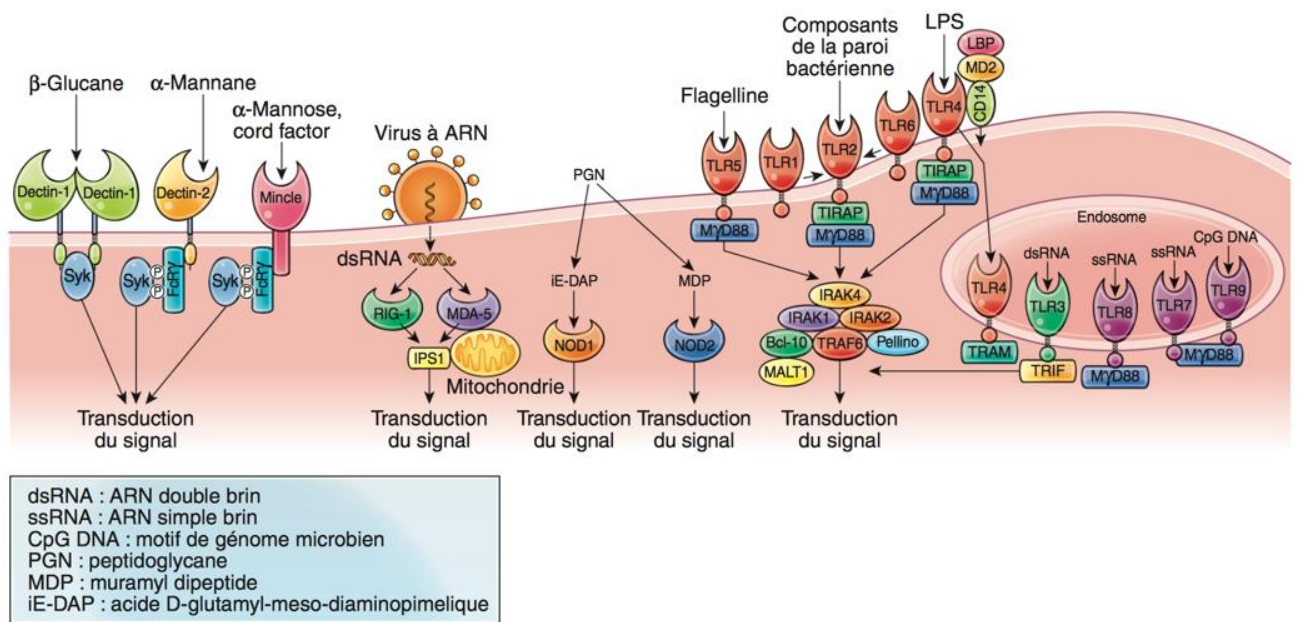


Figure 3: Les récepteurs de l'immunité innée

Le système immunitaire inné reconnaît les motifs bactériens appelés « Pathogen Associated Molecular Pattern » (PAMP) par ses récepteurs appelés Pattern Recognition Receptor ou PRR. L'activation des PRR par les microorganismes, les toxines ou encore des molécules chimiques induit une cascade de signalisations cellulaires qui déclenche une réponse immunitaire. Les PRR se composent de différents récepteurs : les Toll-Like receptors (TLR), les C-type Lectin-like receptors (CTLR), les retinoid acid-inducible gene-1-Like receptors (RLR) et les NOD-like receptors (NLRs).

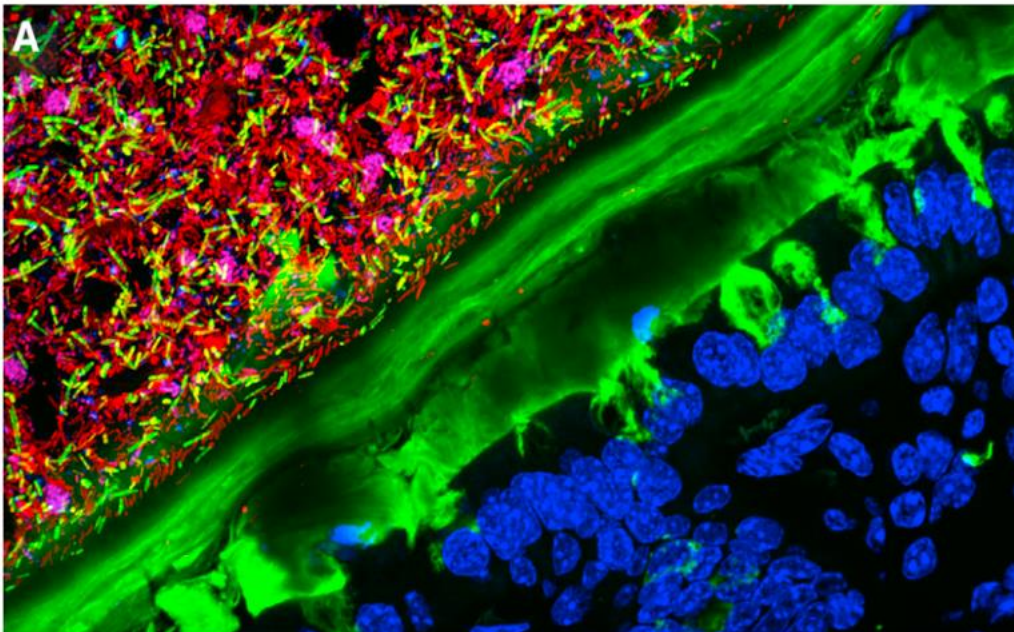
Adapté des « Fondamentaux de la pathologie digestive » de la Société Française de Nutrition de GastroEntérologie.

Les cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules épithéliales intestinales, expriment des récepteurs de l'immunité innée appelés « Pattern Recognition Receptor » (PRR) qui sont capables de reconnaître des motifs bactériens appelés « Pathogen Associated Molecular Pattern » (PAMP) (21). C'est le cas des « Toll-Like Receptors » (TLR). L'activation des PRR par les microorganismes, les toxines, des molécules chimiques induit l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à l'activation ou la modulation de la réponse immunitaire (Figure 3)

### 1.2. Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif se compose d'un réseau complexe de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale connu sous le nom de « plaque de Peyer » et de "Gut Associated Lymphoid Tissue" (GALT). Le GALT se compose de follicules lymphoïdes agrégés et contient 70% des cellules immunitaires du corps humain (22). Il est capable de mettre en place (i) une réponse immunologique contre des microorganismes pathogènes et (ii) une tolérance aux bactéries commensales. Il est également en contact avec la lumière intestinale grâce aux cellules dendritiques et aux cellules M au niveau des plaques de Peyer.

Suite à l'activation des lymphocytes B, ces cellules pénètrent dans le système lymphatique efférent puis dans la circulation systémique par le canal thoracique. Ces cellules colonisent les territoires muqueux, en quittant la circulation sanguine par des veinules post-capillaires. C'est dans la *lamina propria* que les lymphocytes B activés terminent leur différenciation en plasmocytes productrices d'immunoglobulines A (IgA) spécifiques de l'antigène. Ces IgA sont sécrétés sous la forme de dimères, capturés par les récepteurs d'Ig polymériques à la base des cellules épithéliales puis dirigés par transcytose vers la lumière intestinale. Les IgA tapissent ainsi la surface des muqueuses et peuvent capter les antigènes empêchant ainsi leur entrée dans l'organisme (23).



**Figure 4: Coupe distale de colon de souris**

Cette coupe distale de colon de souris illustre la couche de mucus (en vert - UEA-1) séparant l'épithélium du colon (en bleu - DAPI) et le microbiote intestinal, et plus particulièrement les Firmicutes (en jaune) et les Bacteroidales (en bordeaux), détectés par une hybridation in situ à fluorescence.

D'après Carolina Tropini et al 2017

### 1.3. Le microbiote intestinal

#### 1.3.1. Présentation du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal chez l'Homme est un écosystème complexe comprenant au moins  $10^{12}$  microorganismes dans 1g de fèces (24), entre 1000 et 1500 espèces différentes (25) avec une prédominance pour les bactéries de type anaérobie. Le microbiote intestinal compte également des levures, des archées, des virus (en majorité des bactériophages) et des champignons. Le nombre de bactéries suit un gradient croissant le long du tube digestif de l'estomac vers le colon avec une densité colique d'environ  $10^3$ - $10^5$  bactéries par ml de contenu jéjunal et  $10^{11}$ - $10^{12}$  bactéries par ml de contenu colique (26). Le microbiote intestinal est une énorme biomasse bénéfique à l'hôte tapissant le mucus intestinal (Figure 4). Il peut donc être considéré comme un organe à part entière et est capable de s'adapter à son environnement (27).

#### 1.3.2. Méthodes d'études du microbiote intestinal

Comme la majorité des bactéries présentes dans le microbiote ne sont actuellement pas cultivables, il a fallu attendre le développement de techniques de biologie moléculaire pour mieux l'étudier. La taxonomie bactérienne se compose de plusieurs niveaux : le règne (Procaryotae), le domaine (Bactérie), le phylum, la classe, l'ordre, la famille, le genre et enfin l'espèce. Les techniques récentes de séquençage à haut débit ont permis de séquencer une zone du gène codant pour l'ARN Ribosomique 16S (ARNr 16S), ubiquitaire chez les bactéries avec un grand nombre de copies (28). À partir de ces données, une autre taxonomie a donc été développée et basée sur cette séquence. Elle se fonde sur la distance génétique entre les différentes espèces de bactéries et permet de refléter leurs liens de parenté évolutive. Sa structure se compose de régions conservées communes aux bactéries, de régions variables communes à un groupe de bactéries et des régions hypervariables plus spécifiques d'une espèce donnée. L'approche métagénomique permet, quant à elle, de déterminer l'ensemble des gènes microbiens présents dans leur ADN et ainsi définir leurs fonctions (29,30). Enfin, la méthode métatranscriptomique caractérise non pas l'ADN mais l'ARN microbien (31). Cette technique est complémentaire de la métagénomique puisqu'elle permet de mesurer à un temps donné les gènes bactériens transcrits. Le protéome et le métabolome sont également utilisés respectivement dans l'étude des protéines bactériennes et leurs métabolites (32).

#### 1.3.3. Établissement du microbiote intestinal

Concept débattu par certaines études précliniques suggérant la colonisation de l'intestin *in utero* (33), l'intestin du fœtus est dépourvu de microbiote. Ce n'est qu'après la naissance que le nourrisson est colonisé par des bactéries d'origine maternelle telles que le microbiote fécal, vaginal et cutané mais aussi environnemental. La voie de naissance, l'alimentation, le lait maternel et l'antibiothérapie

peuvent également avoir un impact sur sa composition. En premier lieu, le nourrisson est colonisé par des *Enterobacteriaceae* et par *Staphylococcus* (34). Par la suite, des *Bifidobacterium* colonisent l'intestin ainsi que quelques bactéries productrices d'acides lactiques (35). Ce microbiote est maintenu jusqu'à l'introduction de nourriture solide (36,37). Après le sevrage, des bactéries des genres *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Veillonella* colonisent l'intestin de l'enfant (36). Il faut environ trois ans pour que le microbiote soit définitivement établi (27). Par définition, 2-3 ans après la naissance, le microbiote est installé et devient stable dans le temps (27). Si les conditions ne changent pas, les espèces dominantes n'évoluent pas sauf si les conditions environnementales changent drastiquement comme la prise d'antibiotiques, le changement du régime alimentaire ou bien suite à une infection de l'intestin (38–40).

#### 1.3.4. Composition du microbiote intestinal

Deux tiers des espèces dominantes observées sont propres à l'individu. Néanmoins, l'analyse de taxamétrie met en évidence la récurrence de trois phyla bactériens : les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes* et les *Actinobactéries* (41). Le phylum des *Firmicutes* est le plus représenté (de 14 à 31%) (42). Il comprend des bactéries à gram positif et se compose du groupe *Eubacterium restale* – *Clostridium coccoides*. Il se compose lui-même des genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Butyrovibrio*. Les *Firmicutes* se composent également du groupe *Clostridium leptum* (16-22%) dont fait partie les genres *Fecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* (43). Le phylum des *Bacteroidetes* se compose par les genres *Bacteroides* (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*) (9 à 42%). Les *Actinobacteria* est le phylum le moins dominant (0,7 à 10%) et se compose des bifidobactéries et du groupe *Collinsella-Atopobium*. Enfin, les entérobactéries sont plus rarement observées (0,4 à 1%) tout comme les Lactobacilles et les Streptocoques (2%) (44). Une revue de la littérature montre que la composition du microbiote intestinal peut évoluer au cours du vieillissement comme par exemple une diminution de l'abondance des *Clostridiales* comme *F. prausnitzii* (45).

#### 1.3.5. Propriétés

Comme le microbiote intestinal se compose d'un nombre de gènes 100 à 150 fois supérieur comparé à celui du génome humain (25), il y a une diversité microbienne très importante et donc un potentiel fonctionnel. Les espèces bactériennes sont différentes d'un individu à l'autre mais les fonctions du microbiote sont globalement conservées. Le métabolisme de l'hôte est influencé par le métabolisme du microbiote intestinal. En effet, le microbiote est capable de métaboliser par exemple les glucides, et les protéines présentes dans le colon.

- **Le métabolisme des glucides.** 10 à 60 grammes par jour de glucides fermentescibles se retrouvent dans le colon en fonction de la quantité consommée (46). La dégradation anaérobie de ces substrats conduit à la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) comme le butyrate, le propionate et l'acétate. Ces AGCC sont absorbés rapidement par l'épithélium du colon, permettant de fournir de l'énergie et de promouvoir l'absorption colique de sodium (47,48). Certains possèdent même des propriétés d'immunomodulation locale et, comme le butyrate, de stimuler les lymphocytes T de la muqueuse intestinale (49,50).
- **Le métabolisme des protéines.** Les protéines sont les principales sources d'azote et de carbone du microbiote intestinal. Leur source est soit exogène (protéines alimentaires) soit endogène (e.g. enzymes, mucines) et présente la principale source d'azote du microbiote intestinale. L'activité protéasique d'une majorité d'espèces bactériennes permet d'hydrolyser les protéines en peptides et seront utilisés comme source d'énergie (51). Parmi les réactions chimiques, la voie réductrice de désamination est la plus utilisée par les bactéries du microbiote colique aboutissant à la formation d'AGCC.

#### 1.3.6. Rôle du microbiote intestinal sur la régulation de la fonction de barrière intestinale

Le microbiote intestinal intervient dans la fonction de barrière contre des bactéries pathogènes (52). Différents mécanismes permettent d'assurer ce rôle de barrière par les bactéries.

Par exemple, les bactéries peuvent occuper les sites d'adhésion de la paroi intestinale de sorte qu'une autre bactérie ne puisse pas s'y implanter (53). Les bactéries peuvent entrer en compétition avec les pathogènes pour les nutriments. Elles sont également capables de modifier leur écosystème à leur avantage grâce au produit de leur métabolisme (52). La production de bactériocines par les bactéries directement dans la lumière intestinale entraîne la lyse ou l'inhibition de la croissance de souches bactériennes (54,55).

Les bactéries du microbiote intestinal interagissent avec les cellules épithéliales intestinales pour induire l'expression de protéines de jonctions serrées, la sécrétion de peptides antimicrobiens par l'hôte et la sécrétion d'IgA. De plus, des études chez la souris axénique ont permis de mettre en évidence l'impact du microbiote intestinal dans le développement concomitant du système immunitaire. En effet, ces souris présentent une altération de l'immunité caractérisée par une diminution de la taille des plaques de Peyer et des centres germinatifs de l'intestin ou une diminution de la couche de mucus chez les souris axéniques (56).



### 1.3.7. Les probiotiques et leurs effets sur la fonction de barrière intestinale : exemples d'*Akkermansia muciniphila* et *Faecalibacterium prausnitzii*

Selon l'OMS, les probiotiques sont des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ».

#### *Akkermansia muciniphila*

*Akkermansia muciniphila* est une bactérie du genre *Verrucomicrobia* connue pour dégrader le mucus de la paroi intestinale (57). C'est la bactérie la plus abondante au niveau du mucus et représente 3 à 5 % de toute la communauté bactérienne du microbiote intestinal des sujets sains (57,58) et son abondance est inversement corrélée avec le poids corporel (59–62) et le diabète de type 1 et 2 (63) chez l'Homme et la Souris (64). Chez les enfants dénutris, l'abondance d'*A. muciniphila* n'a pas été mise en évidence. Chez la souris dénutrie par un régime pauvre en protéines son abondance fécale diminue (65). L'administration d'un prébiotique, l'oligofructose, chez la souris obèse augmente l'abondance d'*A. muciniphila* (66). Son abondance est corrélée négativement avec les taux plasmatiques de LPS suggérant une diminution de l'endotoxémie (66). Il a également été mis en évidence une augmentation de l'épaisseur du mucus, ainsi qu'une restauration de la glycémie chez ces souris (66).

#### *Faecalibacterium prausnitzii*

*Faecalibacterium prausnitzii*, un clostridiale, est une bactérie de type anaérobie (67). L'abondance de cette bactérie a été corrélée négativement avec la production de calprotectine chez des patients atteints de la maladie de Crohn (68) et induit une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse dans un modèle de colite chimio-induite (69). Il a également été démontré que l'administration d'un composant de *F. prausnitzii*, appelé « Microbial Anti-inflammatory Molecule (MAM) », induisait une inhibition de la voie NF- $\kappa$ B dans des modèles de colite chez la souris (70). Enfin, dans un modèle expérimental du syndrome de l'intestin irritable (SII) induit par une séparation maternelle, l'administration de *F. prausnitzii* induit une diminution de la perméabilité colique (71).

## À retenir

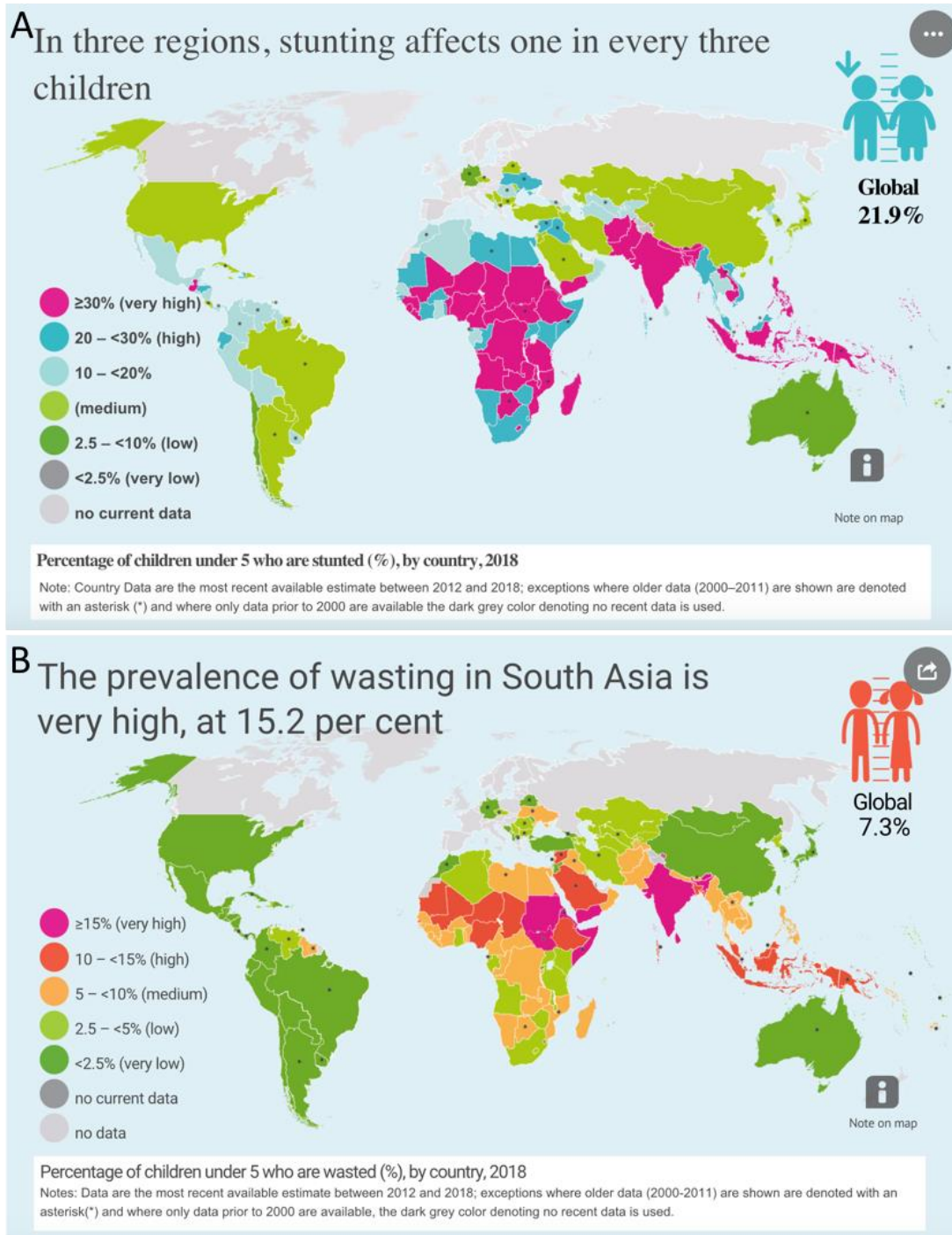
La fonction de barrière intestinale est composée de plusieurs entités :

(i)

Les cellules épithéliales ayant un rôle de barrière physique et chimique contre les pathogènes de l'environnement extérieur. La barrière physique est assurée par la cohésion des cellules épithéliales par des protéines de jonctions serrées (*e.g.* ZO-1, occludine et claudines). Les cellules caliciformes sont des cellules productrices de mucus. Les cellules de Paneth sécrètent dans la lumière intestinale des peptides antimicrobiens. Enfin, les cellules épithéliales expriment des récepteurs de l'immunité innée dont l'activation induit une réponse immunitaire.

(ii)

Le microbiote intestinal exerce des fonctions de protection en entrant en compétition avec les pathogènes pour éviter leur prolifération. Le microbiote intestinal est également capable de renforcer la barrière intestinale en interagissant avec les cellules épithéliales pour induire l'expression de protéines de jonctions serrées, l'induction d'IgA ou la production de peptides antimicrobiens. Il intervient également dans la maturation du système immunitaire.



**Figure 5: Pourcentage d'enfants âgés de moins de 5 ans atteints de malnutrition aiguë sévère dans le monde**

(A) La malnutrition chronique a une prévalence globale de 21,9%. Les pays de l'Afrique subsaharienne et l'Asie du Sud présentent une prévalence supérieure à 30%. (B) concernant la malnutrition aiguë, la prévalence globale est de 7,3% avec une prévalence supérieure à 15% en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud.

*D'après UNICEF/WHO/World Bank Joint Child Malnutrition Estimate, March 2019 edition.*

## 2. La malnutrition

La malnutrition comprend la (i) dénutrition, (ii) l'obésité et (iii) les carences en micronutriments tels que les vitamines et les minéraux. Cette thèse se focalise plus particulièrement sur le versant dénutrition.

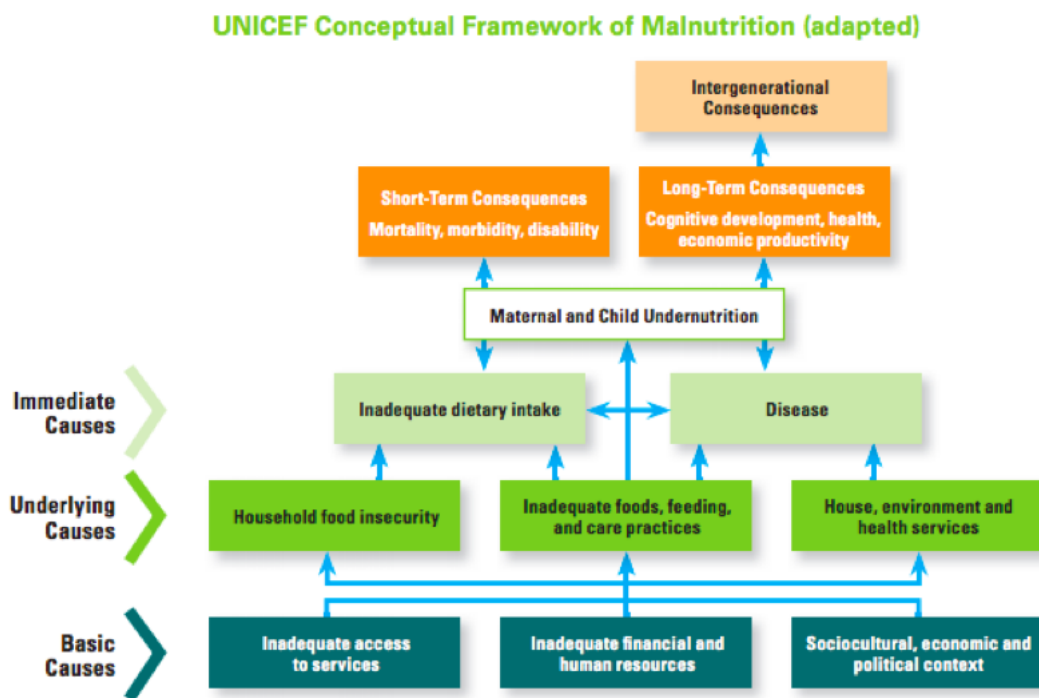
### 2.1. Définitions, prévalence et épidémiologie de la malnutrition aiguë et chronique

Plusieurs formes de dénutrition sont reconnues par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). En premier lieu, la malnutrition aiguë (MA) se définit par une perte de poids rapide ou par une incapacité de l'enfant à prendre du poids (2). Dans cette catégorie, il existe une forme modérée (MAM) et sévère (MAS), plus connue sous le terme « marasme ». Cette catégorie MAS compte également les enfants atteints de « syndrome de Kwashiorkor » (SK) se caractérisant par des œdèmes bilatéraux (2). Certains enfants peuvent être atteints par les deux formes : Marasme-Kwashiorkor (2). En 2018, la MA atteint le nombre de 49,5 millions avec une prévalence globale de 7,3% chez les enfants âgés de moins de 5 ans (1) (Figure 5B). Parmi ces enfants, 17 millions sont atteints par la forme la plus sévère : la malnutrition aiguë sévère (MAS) (1). La forme chronique (MC) se caractérise par un retard de croissance linéaire que l'OMS estime à un rapport taille pour âge inférieur à -2 écart-types (1). En 2018, L'OMS estime à 149 millions le nombre d'enfants âgés de moins de 5 ans dans le monde atteints de MC avec une prévalence globale de 21,9% (1) (Figure 5A). Selon le « Global Burden of Disease study », le nombre de décès associé à la MA, et plus particulièrement la « malnutrition protéique », en 2017 est d'environ 140 300 chez les enfants de moins de 5 ans et a diminué de 38,3% entre 2007 et 2017 (72). Les enfants atteints de MAM ont trois fois plus de risque de mortalité comparé aux enfants bien nourris (73). Le risque de mortalité des enfants atteints de MAS est multiplié par neuf (74).

Les enfants atteints de MAS avec complications médicales (e.g. fièvres, diarrhées) ont typiquement un taux de mortalité allant de 12 à plus de 20% (75,76). Les infections au VIH sont présentes dans 15 à 29% des enfants hospitalisés en Afrique Sub-Saharienne et sont également associés à une très forte mortalité (75,77,78).

### 2.2. Les causes de la malnutrition aiguë

La MA résulte d'un apport insuffisant en macronutriments (protéines, lipides, glucides) et en micronutriments (vitamines et minéraux). Les maladies infectieuses participent également au développement de la MA. En effet, les enfants atteints du VIH ou encore de la tuberculose sont plus à risques de développer une MA (79,80). Les facteurs environnementaux et sociaux comme la pauvreté, l'éducation, l'accès limité aux soins et la contamination de l'environnement sont des causes sous-jacentes de la MA (79,81–83). En Somalie, le nombre d'enfants atteints de MA peut



**Figure 6: Les causes de la dénutrition dans les pays à faibles revenus et à revenus intermédiaires**

Les causes immédiates de la dénutrition infantile sont les maladies infectieuses et la diminution de l'apport en macro et micronutriments. Les causes sous-jacentes sont l'insécurité alimentaire, la difficulté d'accès aux soins, les habitudes alimentaires et l'environnement contaminé. La politique, l'impact socio-économique, socio-culturel participent au fardeau de la dénutrition. Par conséquent, la dénutrition chez l'enfant se caractérise par un risque accru de morbidité et de mortalité à court terme. Elle a également un impact négatif sur le développement cognitif à long terme.

*D'après l'UNICEF*

également atteindre des proportions importantes dans des situations de migration, de conflits ou de famine (84). D'autres risques peuvent être cités, comme un allaitement insuffisant ou encore une pratique alimentaire complémentaire insuffisante (85) (Figure 6).

### 2.3. Protocole de prise en charge de la MA

Le protocole de prise en charge de la MA a été rédigé par l'OMS (2). La première étape du protocole est de déterminer la sévérité de la MA, et d'adapter ainsi le protocole de prise en charge.

#### 2.3.1. La malnutrition aiguë modérée (MAM)

La MAM se caractérise par un rapport poids pour taille inférieur à -2 de l'écart-type de la médiane de la référence OMS chez les enfants âgés de moins de 5 ans (2). L'enfant atteint de MAM sera traité avec des suppléments alimentaires à base de lipides ou « *Ready to Use Supplementary Food* » (RUSF) complétant leur alimentation quotidienne.

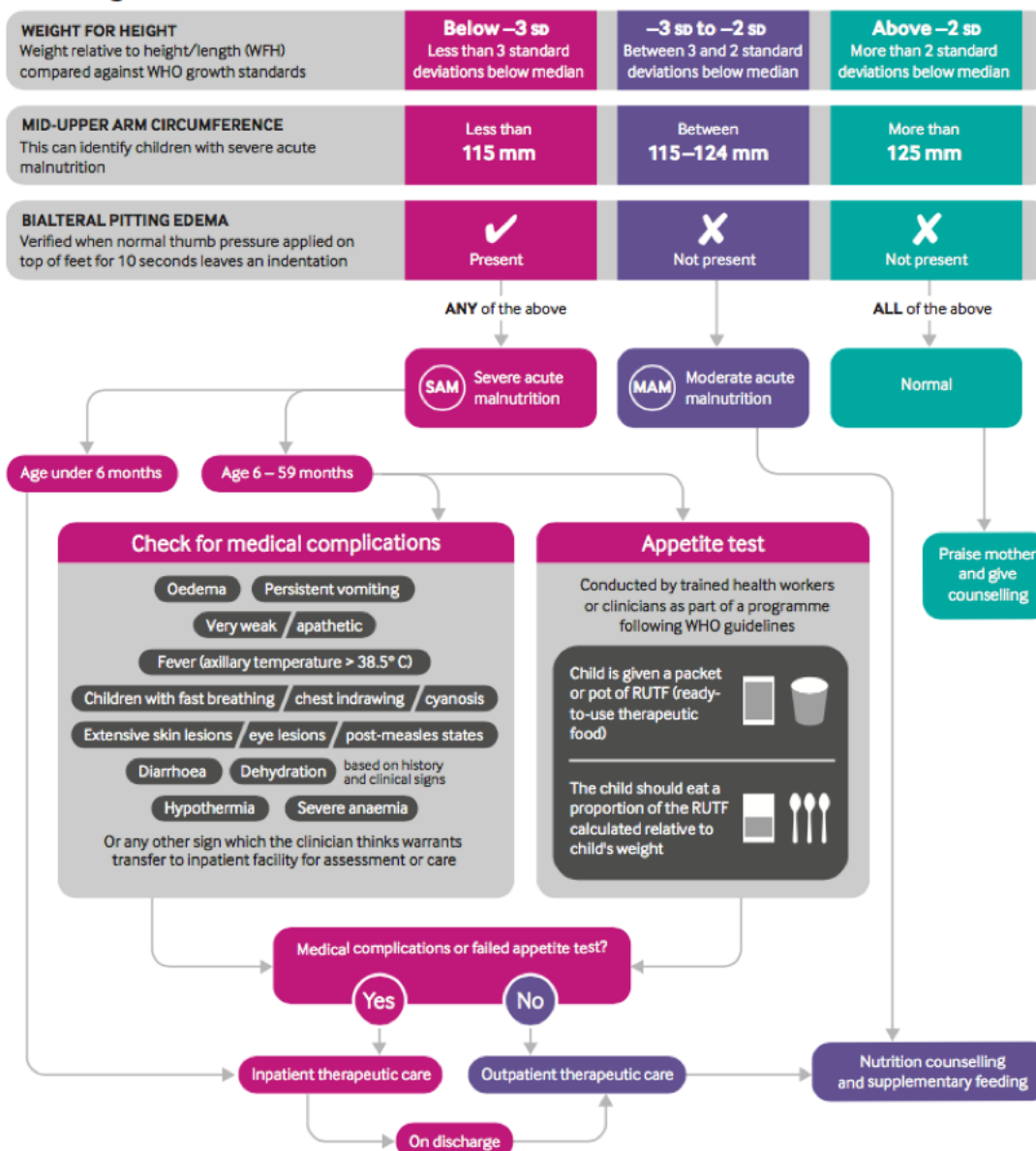
#### 2.3.2. La malnutrition aiguë sévère (MAS)

La MAS est mise en évidence par un rapport poids pour taille inférieur à -3 de l'écart-type de la médiane de la référence OMS chez les enfants âgés de moins de 5 ans (2). D'autres mesures de diagnostic peuvent être utilisées telles que : (i) Le périmètre brachial (PB) ou « *Mid Upper Arm Circumference* » (MUAC) inférieur à 115mm pour le diagnostic de la MAS ou (ii) les œdèmes nutritionnels bilatéraux diagnostiquant le SK (2). Le suivi médical lors de la renutrition des enfants atteints de MA se fera avec le même outil de référence (2).

Les cas de MAS non compliqués seront traités avec des compléments alimentaires appelés « *Ready to Use Therapeutic Food* » (RUTF) en remplacement de leur alimentation directement au domicile. Ces enfants seront également sous antibiotiques et vermifuges (2).

Les enfants avec complications médicales sont pris en charge dans les centres de soin. La phase 1 dite de « stabilisation » nutritionnelle de ces enfants commence par l'administration d'une solution nutritionnelle à base de lait peu dense en énergie (130 ml/kg par jour de F-75, 97.5 kcal/kg par jour). La formule F-75 est pauvre en protéines, en sodium et permet de s'adapter au métabolisme adaptatif de l'enfant. Cette étape permet d'améliorer le métabolisme, la motricité intestinale, l'absorption des nutriments et une amélioration du statut clinique mis en évidence par un regain d'appétit ou la disparition des œdèmes si présents. Si l'enfant retrouve l'appétit et qu'il n'a plus de complications médicales, il sera alors nourri avec des solutions nutritionnelles plus riches en énergie comme les RUTF ou encore un lait thérapeutique comme F100 (130–200 ml/kg par jour, 130–200 kcal/kg par jour). Comme précédemment décrit pour les enfants atteints de MAS sans complications médicales,

## Screening criteria



**Figure 7: Critères de diagnostic et protocole de prise en charge nutritionnelle de la malnutrition aiguë**

À la prise en charge de l'enfant, la sévérité de la MA est évaluée par le rapport poids pour taille, la circonférence brachiale ou la présence d'œdèmes bilatéraux (syndrome de Kwashiorkor). (i) Si l'enfant présente une MAM, des compléments alimentaires lui seront prescrits. (ii) S'il est atteint de MAS sans complication médicale, il lui sera prescrit un lait thérapeutique riche en macronutriments ou une pâte nutritive (RUTF). (iii) Si l'enfant a des complications médicales et n'a pas d'appétit, une phase de stabilisation nutritionnelle (phase 1) avec un lait thérapeutique F-75 pauvre en protéines et en sodium sera préconisée. Des solutions nutritionnelles plus riches tels que le lait thérapeutique F100 ou RUTF seront proposés.

*D'après Ghosh-Jerath et al 2017.*

la consommation de RUTF doit être exclusive à l'exception du lait maternel et se fait dans le cadre familial.

Il n'y a pas de supplémentation en micronutriments (comme le zinc en traitement de la diarrhée) car ces derniers sont déjà inclus et donc généralement non nécessaires sans signes spécifiques de carence.

Les outils décrits précédemment sont illustrés dans la Figure 7.

#### 2.4. Conséquences et mécanismes physiopathologiques de la malnutrition

Dans ce chapitre, les mécanismes physiopathologiques de la MA seront mis en évidence ainsi que leurs conséquences sur l'organisme (Figure 8).

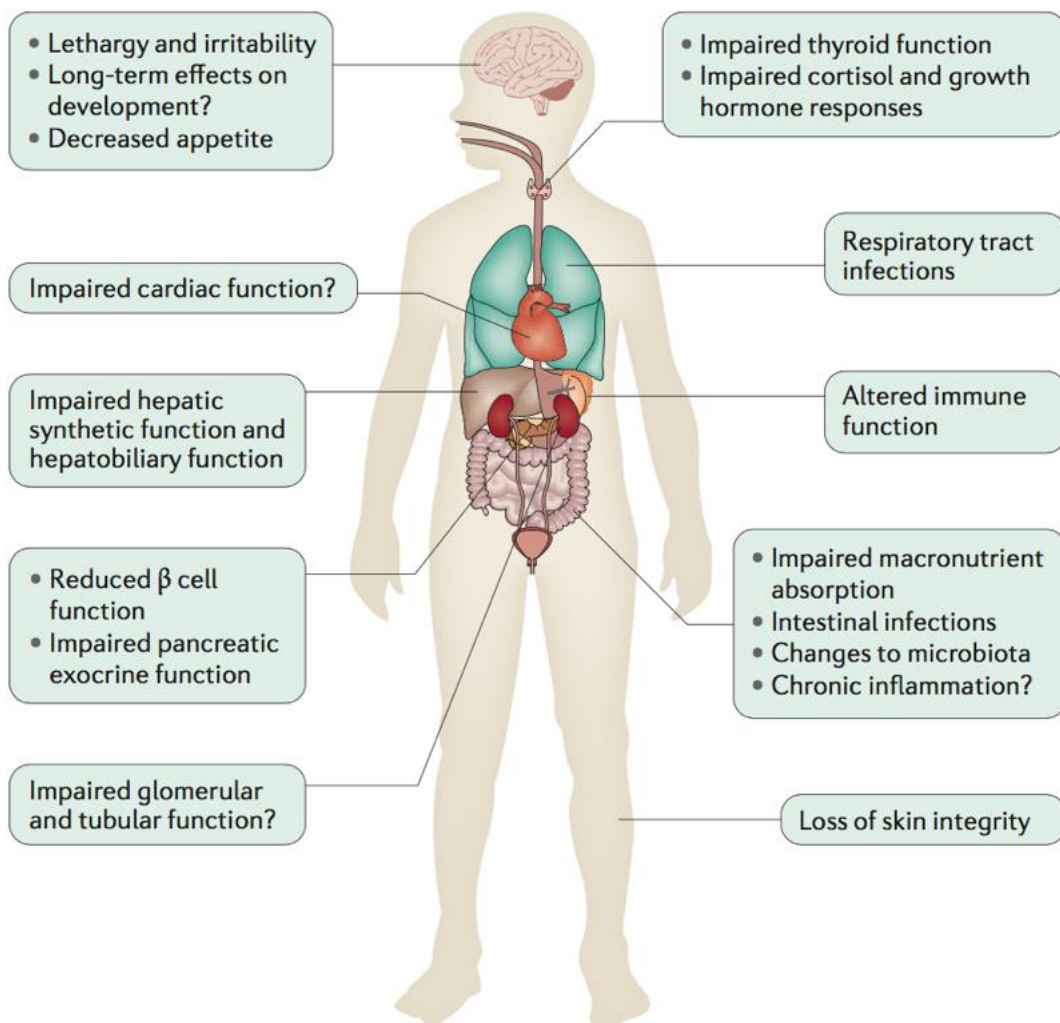
##### 2.4.1. Physiopathologie du retard de croissance pondérale

La MA se caractérise par une perte de poids suite à une fonte musculaire et une perte de masse grasse. Les données de la littérature sur le jeûne et la cachexie ont permis de comprendre les mécanismes et les changements métaboliques associés au retard de croissance pondérale. Durant les premiers jours de jeûne, les réserves de glycogène sont épuisées, la néoglucogenèse est activée à partir des radicaux carbonés des acides aminés et du glycérol (86–88). Durant cette période, la protéolyse musculaire gérée par le système ubiquitine-protéasome libère les acides aminés se caractérisant par une fonte musculaire (89,90). Au plus long terme, le jeûne prolongé se caractérise par une perte azotée quotidienne moins importante (91–93). Dans cette situation, la fonte musculaire est moins rapide et les réserves lipidiques sont utilisées. En effet, les taux de corps cétonique plasmatique, produit de la cétogenèse dans le foie à partir des acides gras, sont augmentés (94–96). Dans une situation de cachexie, il a également été observé une activation importante de la voie ubiquitine-protéasome, voie de dégradation des protéines myofibrillaires (97). L'autophagie, caractérisée par la dégradation des organites internes cellulaires par les lysosomes, a également été mise en évidence comme un acteur important de la dégradation de la masse maigre dans cette situation (98,99). Ce processus est considéré comme néfaste pour les cellules musculaires puisqu'il participe à la suppression de composés cellulaires très importants (e.g. mitochondries) pour le métabolisme musculaire et sa contraction (100). L'autophagie chez les enfants atteints de MA n'a pas été étudiée au niveau musculaire. Cependant, chez la souris dénutrie, un régime pauvre en protéines induit une augmentation de l'autophagie dans le muscle squelettique (101).

##### 2.4.2. Métabolisme des lipides

Peu d'études ont documenté le métabolisme des lipides chez les enfants atteints de MA. Cependant, il a été montré que la lipolyse était stimulée en cas de famine (102,103) chez les enfants avec MA





**Figure 8: Les conséquences de la malnutrition aiguë sévère**

La malnutrition aiguë sévère induit chez l'enfant des dysfonctions hépatiques, cardiaques et rénales. Elle peut également induire une altération du système immunitaire, du métabolisme des lipides et des glucides et peut également avoir pour conséquence un retard cognitif au long terme.

*D'après Bhutta et al 2017*

(102). De plus, en début d'admission en centre de soin, une autre étude a mis en évidence une augmentation des taux d'acylcarnitine plasmatique, suggérant une oxydation préférentielle des acides gras et donc de leur utilisation comme source d'énergie (104).

#### 2.4.3. Métabolisme des glucides

L'homéostasie du glucose est également altérée. Elle est mise en évidence par une hypoglycémie commune à la MA et SK (105,106). De plus, le SK est associé à une diminution de la production endogène de glucose comparé aux enfants MA contribuant à l'hypoglycémie (107). La clairance du glucose sanguin et son assimilation au niveau tissulaire, régulée par l'insuline, sont affectées chez les enfants atteints de MA et de SK (107–109). La diminution de la réponse pancréatique serait en partie en cause de cette altération sans pour autant affecter la sensibilité à l'insuline (110). Cependant, les mécanismes de la fonction pancréatique chez les enfants MA restent à ce jour mal compris. Chez le rat dénutri, il y a une diminution de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine kinase AMPc-dépendante associée à une diminution de la sécrétion d'insuline (111). De plus, il n'y a pas de données claires concernant la réponse du pancréas au glucagon chez les enfants atteints de MA. La concentration en glucagon a été reportée comme étant légèrement diminuée durant la phase aiguë de la malnutrition comparée à ceux en phase de réhabilitation nutritionnelle (107). La même observation a été mise en évidence chez des enfants atteints de MA comparée à une cohorte contrôle dans une étude jamaïcaine (112).

#### 2.4.4. Le stress oxydant

Le stress oxydant a souvent été associé avec la malnutrition et plus particulièrement avec le SK. En effet, les enfants atteints de MAS présentent une diminution des taux d'antioxydants plasmatiques (e.g. la vitamine E et le glutathion) par rapport aux enfants non atteints. Cette réduction est d'autant plus importante chez les enfants atteints du SK (113–115). La cause de cette diminution serait (i) soit une diminution de la prise alimentaire et donc de l'absorption des antioxydants, (ii) soit une diminution de leur synthèse (e.g glutathion) (116). Un déséquilibre entre les ROS et ces antioxydants aurait un rôle dans la physiopathologie du SK (114). En revanche, une étude randomisée menée au Malawi n'a pas montré d'effet préventif de la prise orale d'un mélange de vitamines et de minéraux (riboflavine, vitamine E, sélénium et N-Acétylcystéine) sur le développement du SK (117).

#### 2.4.5. La fonction hépatique

Le SK est associé à une dysfonction du métabolisme hépatique pouvant conduire à une stéatose hépatique non alcoolique (118). La stéatose hépatique serait également expliquée par l'augmentation de l'oxydation lipidique au niveau du foie (103). Ce paramètre est très difficile à mesurer chez l'enfant. Néanmoins, des données *post-mortem* et des données d'études précliniques

suggèrent une dysfonction mitochondriale à l'origine de la stéatose hépatique (107,119–121). De plus, une corrélation entre l'activité mitochondriale et la réduction de la synthèse du glucose chez les enfants atteints du SK a été observée (107).

#### 2.4.6. La fonction cardiaque et l'hémodynamisme

Historiquement, des études observationnelles ont mis en évidence une atrophie cardiaque et une diminution du débit cardiaque chez les enfants atteints de MAS (122) et cela de manière beaucoup plus importante chez les enfants atteints de SK (123). Cependant, il n'y a pas de données cliniques sur l'étiologie des mécanismes induisant cette atrophie. Une restriction calorique chez le rongeur entraîne une diminution du volume myofibrillaire et de la longueur des capillaires (124). Chez le porcelet avec dénutrition induite par un régime à base de maïs (MAIZE-diet), pauvre en protéines et en phosphate, il y a une dysfonction cardiaque caractérisée par une performance myocardique élevée (125). De plus, cette étude indique également une augmentation de la production de « pro-atrial natriuretic peptide » (proANP) et de « Troponin-1 », biomarqueurs d'une dysfonction cardiaque (125). Récemment, ces deux biomarqueurs ont été évalués chez des enfants avec une dénutrition protéinergique en Indonésie avec une meilleure sensibilité pour la Troponin-1 et présentent également une diminution de la masse ventriculaire gauche (126).

#### 2.4.7. La fonction rénale

Les études sur la fonction rénale sont assez limitées chez les enfants MA. Une diminution du taux de filtration glomérulaire a été mise en évidence chez des enfants MA déshydratés (127). De plus, d'autres données montrent, en plus d'un taux de filtration glomérulaire diminuée, une dysfonction tubulaire avec une diminution de l'osmolalité des urines (128).

#### 2.4.8. La fonction cérébrale

La MA est associée avec une altération importante de la fonction cérébrale et du comportement. Les enfants atteints de SK ont une atrophie cérébrale (129,130) et peuvent présenter une irritabilité alors que ceux atteints de marasme sont plutôt apathiques. De plus, il a été décrit une altération du développement cognitif suite à un épisode de MAS (131). Son étiologie a très peu été étudiée et les mécanismes physiopathologiques sont très peu compris. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre cet effet à long terme. Au contraire, le déficit cognitif associé à la MC est bien décrit dans la littérature puisqu'une augmentation de 10% de sa prévalence diminue de 7,9% la proportion d'enfants atteignant la fin de l'école primaire (132,133).

#### 2.4.9. Altération des défenses immunitaires

Les enfants atteints de MA développent une immunodéficience secondaire (134). D'autres altérations peuvent également être observées telles qu'(i) une dysfonction des lymphocytes T, (ii)

d'une réduction de l'activité des neutrophiles, (iii) d'une diminution du nombre de cellules dendritiques, de l'amorçage et de la présentation de l'antigène ou encore (iv) une diminution des niveaux des protéines du complément (134). L'atrophie du thymus, l'hyporéactivité des lymphocytes T et la diminution de leur prolifération peuvent être également la conséquence d'une activation chronique du système immunitaire et/ou d'une demande métabolique accrue de glucose, d'acides aminés et d'hormones (e.g. Leptine) par les lymphocytes T contribuant au développement de la MA (135–137).

Cette altération de la fonction immunitaire peut également avoir un impact sur la mise en place d'une dysfonction entérique environnementale. L'hypothèse serait qu'en raison de l'immunodéficience acquise chez les enfants atteints de MAS, ces derniers seraient plus susceptibles aux infections par des bactéries pathogènes de l'environnement. Ces bactéries auront soit des effets directs sur le développement de la dysfonction entérique environnementale (138) ou indirects en modulant la composition du microbiote intestinal (139). La dysfonction entérique environnementale se caractérise par (i) une augmentation de la perméabilité intestinale, (ii) une inflammation de bas grade (iii) une atrophie des villosités et (iv) une malabsorption des nutriments (140,141). Cette dysfonction de la barrière intestinale aggraverait ou serait une cause du retard de croissance et limiterait le bénéfice des formulations nutritionnelles (9). La dysfonction entérique environnementale, ses causes et ses conséquences sur la santé de l'enfant seront présentées dans la partie suivante.



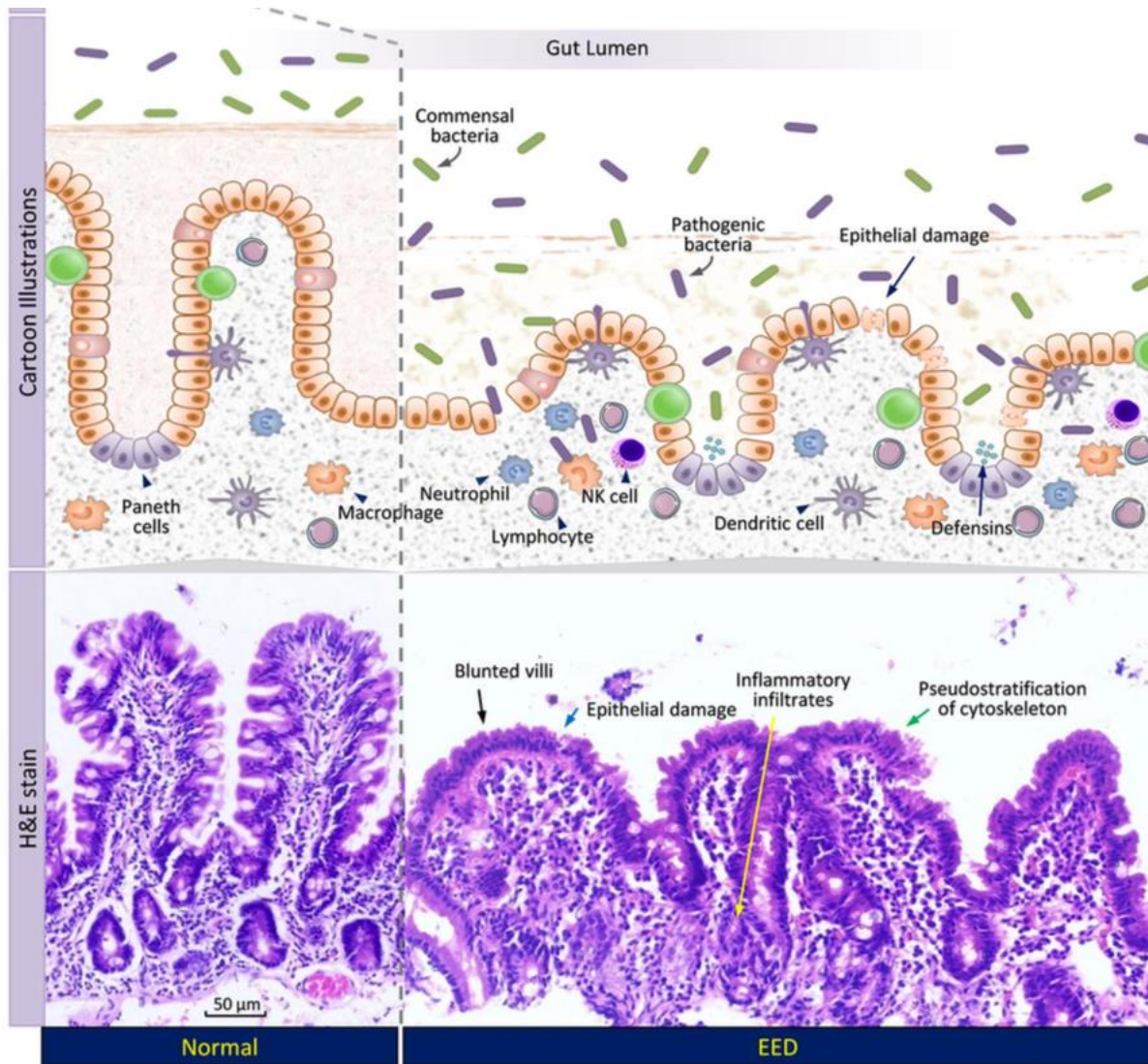
## À retenir

La malnutrition aiguë se caractérise par une perte rapide de poids ou une incapacité à prendre du poids. La MA a une prévalence globale de 7,3% dans le monde chez les enfants âgés de moins de 5 ans (52 millions atteints de MA). 17 millions sont atteints de MAS. La MAS se caractérise par un rapport poids pour taille inférieur à -3 de écart-type, un PB < 115 mm ou par la présence d'œdèmes nutritionnels (cas des Kwashiorkor)..

Les maladies infectieuses et/ou la diminution de la consommation de macronutriments (glucides, lipides et protéines) et en micronutriments (vitamines et minéraux) sont les causes principales de la dénutrition infantile pouvant se manifester cliniquement par une malnutrition aiguë sévère (marasme et/ou un syndrome de Kwashiorkor) avec ou sans complications médicales. Les facteurs contribuant à la MA sont un environnement contaminé, le manque d'accès à l'eau potable et à l'insécurité alimentaire, l'économie et le manque d'accès aux soins. Les facteurs sous-jacents sont d'ordre social, culturel et politique.

La morbidité et la mortalité sont des conséquences immédiates de la MA. À long terme, la MA peut induire un retard cognitif, une diminution de la performance scolaire, un retard du développement moteur et une productivité amoindrie.

La diminution de l'efficacité du système immunitaire peut contribuer au développement d'une dysfonction entérique environnementale. Celle-ci est caractérisée par une augmentation de la perméabilité et à une inflammation intestinale et compromet la barrière intestinale en diminuant l'absorption des nutriments.



**Figure 9: La dysfonction entérique environnementale**

La dysfonction entérique environnementale (DEE) se caractérise par (i) une hyperperméabilité intestinale, (ii) une inflammation de bas grade et une infiltration de cellules immunitaires (iii) une atrophie villositaire, (iv) une diminution de l'épaisseur du mucus et (v) une malabsorption des nutriments. La DEE se réfère au phénomène de dysfonction de barrière intestinale et non pas à un syndrome clinique avec des critères diagnostics.

*D'après Trehan et al 2016.*

### 3. La Dysfonction Entérique Environnementale

#### 3.1. Caractéristiques de la dysfonction entérique environnementale

La dysfonction entérique environnementale (DEE) se caractérise par (i) une atrophie des villosités, (ii) une infiltration de cellules immunitaires, (iii) une hyperperméabilité intestinale, (iv) une diminution de l'épaisseur du mucus et (v) une malabsorption des nutriments (7,8,142). La DEE se réfère au phénomène de dysfonction de barrière intestinale et non pas à un syndrome clinique avec des critères diagnostics (Figure 9). La DEE peut être présente chez des enfants MAS avec diarrhée (143) mais peut également être asymptomatique et présente chez les individus en bonne santé (144).

La DEE n'a pas été reconnue comme un problème de santé prioritaire depuis sa découverte dans les années 60 par *Lindenbaum et al.* (144). La DEE a depuis été décrite comme une cause potentielle de retard de croissance des enfants vivants dans les pays à faibles revenus et à revenus intermédiaires. La DEE est associée à un faible développement cognitif et une faible efficacité vaccinale (145–147). Par exemple, les vaccins oraux contre les rotavirus et la polyomyélite ont échoué dans une étude clinique impliquant des enfants au Bangladesh (20,2% et 68,5% respectivement) et 28,6% d'entre eux étaient dénutris(148).

#### 3.2. Étiologie de la dysfonction entérique environnementale

L'étiologie de la DEE est non connue. Actuellement, plusieurs hypothèses sont proposées dans la littérature. La DEE se développerait en raison de l'exposition continue de la nourriture, de l'eau ou d'autres vecteurs contaminés. Cependant, la DEE a longtemps été mal comprise. En effet, une étude a montré une augmentation de la perméabilité intestinale chez des sujets sains uniquement dans les zones économiquement défavorisées (6). Cela supporte l'idée que la DEE est dépendant du statut socio-économique et non du climat.

D'autres études ont montré que la DEE se développait en fonction de l'environnement et non pas en fonction de son origine ethnique. Des études dans les années 60 ont montré une hyperperméabilité intestinale dans une population Pakistanaise locale par rapport à des Pakistanais vivants aux États-Unis (144,149). Cette hyperperméabilité intestinale a également été observée chez des volontaires américains de la Peace Corp au Pakistan (149). Cette même étude a également montré la réversibilité de l'hyperperméabilité intestinale environ 5 mois après leur retour aux États-Unis (149). Cette réversibilité a également été mise en évidence chez des individus d'origine indienne et pakistanaise venus s'installer aux États-Unis (150).

#### 3.3. Prévalence et épidémiologie

La prévalence et l'épidémiologie de la DEE chez les enfants dénutris n'est pas décrite dans la littérature. Ceci s'explique par la difficulté de prélever des biopsies duodénales chez l'enfant dans les



centres de soin. En Gambie, une augmentation du rapport lactulose/mannitol urinaire, marqueur d'hyperperméabilité intestinale, a été décrite chez la majorité des jeunes enfants dans plusieurs études (146,151,152). De plus, cette hyperperméabilité intestinale a été corrélée avec le retard de croissance pondérale au Guatemala et au retard de croissance linéaire en Gambie, au Népal, au Bangladesh et au Malawi (153–156). Toutes ces études suggèrent que la DEE est très répandue dans les pays à faibles revenus et à revenus intermédiaires.

### 3.4. Causes de la DEE et mécanismes physiopathologiques

#### 3.4.1. Impact des bactéries et du microbiote intestinal sur le développement de la DEE.

L'ingestion continue de bactéries fécales dans la partie haute du système digestif pourrait être une des causes de la DEE puisqu'elle induirait la prolifération bactérienne dans cette partie de l'intestin dans les pays à faibles revenus et à revenus intermédiaires (157).

Afin d'identifier les marqueurs de la DEE et de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de cette dysfonction entérique, Philippe Sansonetti et Pascale Vonaesch, de l'institut Pasteur de Paris, dirigent le projet AFRIBIOTA en collaboration avec l'institut Pasteur de Madagascar et de Bengui. Récemment, *Vonaesch et al.* ont décrit une « décompartmentalisation » du microbiote intestinal caractérisée par une présence accrue de bactéries, normalement présentes dans la zone oro-pharyngée de l'estomac jusqu'au colon et qu'elle était également associée au retard de croissance (139). Ils montrent aussi une plus grande prévalence d'*Escherichia coli/Shigella sp.* et *Campylobacter sp.* chez les enfants atteints de malnutrition chronique (139).

L'autre hypothèse serait l'impact de cette ingestion, non pas sur la prolifération, mais le développement d'une dysbiose, ie une perturbation de la composition du microbiote intestinal. De manière intéressante, une étude au Bangladesh indique une immaturité du microbiote intestinal colique corrélée avec le retard de croissance (158). Dans le cadre de la MAS, une dysbiose a également été observée par *Million et al.*(159). En effet, cette dysbiose se caractérise par une diminution des taux de bactéries anaérobies telles que *Bacteroidaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae* et *Ruminococceae* mais aussi par une augmentation de la présence de bactéries aérobies pathogènes à potentiel pro-inflammatoire comme *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus* (159). Concernant les archées, une diminution drastique de *Methanobrevibacter smithii* a également été détectée à cause de l'oxydation intestinale présente chez les enfants dénutris (159). *M. smithii* serait également impliqué dans la digestion des aliments en participant à la 'conversion alimentaire' (ratio entre la nourriture ingérée et le gain de poids) (159). Dans une étude récente au Niger, il a été démontré une augmentation de la présence de Fucobactéries et de Protéobactéries chez des enfants atteints de SK et une diminution de la présence de *Bacteroidetes*

chez les enfants atteints de marasme (160). *Attia et al.*, décrivent une augmentation du nombre de *Shigella*, *Giardia* et de *Campylobacter* chez les enfants MAS (9). Ces pathogènes n'ont cependant pas été corrélés avec la mortalité et les diarrhées (9). Dans cette même étude, une diminution des taux de butyrate et de propionate, des acides gras à chaîne courte (AGCC) a été mise en évidence (9). De manière intéressante, la diminution de la production d'AGCC a été associée à une augmentation de l'inflammation intestinale dans un modèle d'iléus chronique chez le lapin (161).

*Kau et al.* ont montré que des entérobactéries induisant une réponse IgA étaient impliquées dans le développement de la MAS (162). Pour le démontrer, des souris gnotobiotiques dénutries ont reçu ces bactéries et ont par la suite développé une diminution de la taille des cryptes coliques, une perte de poids plus importante et un sepsis (162).

Concernant la malnutrition chronique, un consortium appelé MAL-ED (pour "Malnutrition and Early Disease") étudie à long terme (sur cinq ans) le lien entre le développement de la MC et la DEE. Une étude au Bangladesh démontre que les infections entériques, plus particulièrement *Shigella* et *E. coli* entérotoxigène (ETEC) sont associées à la DEE et au retard de croissance durant les deux premières années de vie (163). Deux autres études montrent qu'*E. coli* entéroaggrégative est également associée aux marqueurs de l'inflammation intestinale (*e.g.* lactoferrine, MPO) et au retard de croissance (164,165).

#### 3.4.2. Activation de l'inflammation

L'exposition chronique aux bactéries fécales dans l'environnement pourrait induire une réponse inflammatoire. En effet, une DEE a été mise en évidence chez des enfants dénutris avec diarrhées caractérisée par une infiltration de lymphocytes T dans la *lamina propria* au niveau du duodénum (143). De plus, le rapport entre les cytokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$  et IL-10) et pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) est diminué chez les enfants atteints de MAS par rapport à la cohorte d'enfants du groupe contrôle (143). Cette étude indique que l'inflammation développée durant la DEE est médiée par une réponse inflammatoire chronique lymphocytes T-dépendante.

#### 3.4.3. Translocation bactérienne

En Gambie, des enfants âgés entre 8 et 64 semaines vivants dans des zones rurales montrent une augmentation de la concentration plasmatique d'endotoxines suggérant une translocation bactérienne (151). De plus, cette concentration est corrélée avec le retard de croissance et la DEE (151). Cette étude a également mis en évidence une corrélation négative entre les immunoglobulines G anti-endotoxine avec la croissance linéaire et la perméabilité intestinale (rapport Lactulose/Mannitol)(151). Ces résultats indiquent que l'augmentation de la perméabilité intestinale

induit une translocation de composés bactériens dans le sang pouvant induire une réponse immunitaire puis un retard de croissance (151).

### 3.5. Conséquences de la DEE

#### 3.5.1. Développement du retard de croissance

La communauté scientifique a longtemps pensé que la diarrhée était une des causes du retard de croissance linéaire. En effet, une étude longitudinale chez des enfants âgés de 24 mois a montré que la probabilité de développer un retard de croissance à cet âge est de 2,5% par épisode de diarrhée et serait responsable de 25% des retards de croissance infantile durant cette période (166). Afin de réduire l'incidence des diarrhées, et donc d'améliorer la croissance linéaire, des mesures ont été prises et cela inclut (i) le développement et l'optimisation de solutions orales de réhydratation de basse osmolarité, (ii) la supplémentation en zinc, (iii) les campagnes de sensibilisation à l'allaitement, (iv) l'utilisation de vaccins contre certains entéropathogènes (*e.g.* rotavirus) et (v) la promotion de l'assainissement de l'eau et de l'hygiène (167). Grâce à ces dispositions, la mortalité a baissé drastiquement allant de plus de 5 millions de décès dans les années 1980 à moins de 1 million dans les années 2010 (168,169).

Cependant, cela n'a pas toujours permis d'améliorer la croissance des enfants puisqu'une revue de la littérature établie par *Bhutta et al.* a observé une diminution d'un tiers de la prévalence du retard de croissance linéaire à 36 mois (167). De plus, une méta-analyse de 38 études cliniques a montré que différentes réhabilitations nutritionnelles (*e.g.* RUTF, RUSF, éducation alimentaire et nutritionnelle) permettaient une amélioration de la croissance staturo-pondérale (gain de poids moyen de 760g et augmentation de 1,7cm en taille) sans pour autant atteindre une croissance optimale chez les enfants en retard de croissance (170).

Ces données suggèrent que les infections responsables des diarrhées *per se* ne sont pas les seules à l'origine de ce retard de croissance. C'est à partir de ces observations que l'hypothèse de la DEE comme facteur important dans sa persistance est apparue (171). De plus, le retard de croissance se développe durant les deux premières années de vie et serait irréversible (73). Il est donc nécessaire de diagnostiquer la DEE le plus tôt possible.

#### 3.5.2. La réponse vaccinale

Une étude randomisée conduite par *Naylor et al.* a mis en évidence que la mauvaise réponse vaccinale avant l'âge de deux ans était étroitement corrélée avec les marqueurs de l'inflammation systémique et intestinale (148). Une autre étude montre également l'inefficacité d'un vaccin oral contre la poliomyélite même après un traitement antibiotique. La séroconversion était négativement

corrélée avec la présence de pathogènes viraux dans les selles (entérovirus, adénovirus, rotavirus) (172). Cette étude suggère qu'une interférence entre des virus pathogènes et le mécanisme immunitaire induit par le vaccin serait un autre facteur possible d'inefficacité chez les enfants des pays à faibles revenus et revenus intermédiaires.

### 3.5.3. Développement neurocognitif

Les infections entériques par *Giardia* (173), *Cryptosporidium* (174), les épisodes de diarrhée et le retard de croissance durant les premières années de vie sont associés à un retard neurocognitif au long terme (173–176). Cependant, les mécanismes physiopathologiques ne sont pas connus. Des études précliniques chez l'animal ont mis en évidence un effet délétère de l'induction d'une inflammation sur le développement neurocognitif durant la période périnatale (177,178). Par exemple, l'injection intraveineuse d'une solution de lipopolysaccharide (LPS) deux semaines après la naissance induit une altération du comportement émotionnel à l'adolescence (30 jours *post-partum*) et à l'âge adulte (90 jours *post-partum*) chez la souris. Ces résultats s'expliqueraient par une diminution de la phosphorylation des récepteurs aux glucocorticoïdes dans le cortex préfrontal de l'animal (178). En effet, une étude chez le rat montre que l'inhibition des récepteurs aux corticoïdes des neurones du cortex préfrontal induit un comportement dépressif chez l'animal détecté par une immobilisation de l'animal lors du test de la nage forcée (179).

### 3.5.4. Impact de la dysfonction entérique environnementale et la malnutrition aiguë sévère

Dans une étude observationnelle au Malawi, les enfants atteints de MAS avec complications médicales ayant besoin de traitement à l'hôpital (2) présentent une augmentation de marqueurs inflammatoires comme la calprotectine fécale, des taux de cytokines pro-inflammatoires plasmatiques et une production diminuée des AGCC tel que le butyrate (9). De plus, les paramètres inflammatoires et la diminution de la production de butyrate sont associés à la mortalité dans cette étude (9).

Dans une étude clinique réalisée en Zambie, les enfants MAS atteints de diarrhées présentent une dysfonction de la barrière intestinale caractérisée par une diminution de la surface d'absorption de l'intestin grêle (180). Le même groupe de chercheurs a plus tard mis en évidence une diminution de la taille des villosités et une infiltration leucocytaire chez des enfants ayant les mêmes critères diagnostiques (181). La taille des villosités est inversement corrélée avec la perméabilité intestinale dans cette étude (181). Ces données suggèrent que les enfants atteints de MAS peuvent être atteints de DEE et que cette dysfonction aurait un impact sur l'absorption des nutriments. En effet, *Attia et al* ont mis en évidence une moins bonne efficacité des traitements contre la dénutrition chez des enfants MAS avec complications médicales (9). Ces données suggèrent que la DEE serait responsable

en partie de la diminution de l'absorption des nutriments par l'intestin grêle diminuant ainsi l'efficacité des solutions nutritionnelles. L'enfant entrerait alors dans un cercle vicieux avec une exacerbation de son état de dénutrition (Figure 10).

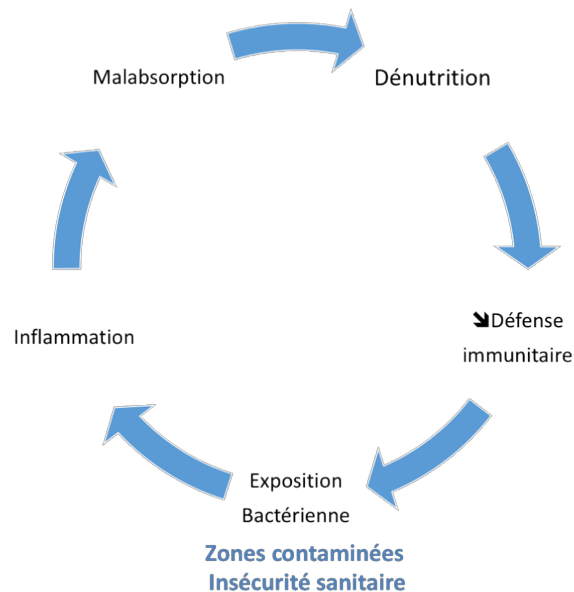


Figure 10: Hypothèse du cercle vicieux

L'altération du système immunitaire des enfants MA les rendrait plus susceptibles aux infections bactériennes et donc au développement d'une DEE. La DEE est caractérisée par une augmentation de l'inflammation, de la perméabilité intestinale et d'une diminution de l'absorption. La DEE aggraverait alors l'état de dénutrition de l'enfant. MA: Malnutrition Aiguë ; DEE: Dysfonction Entérique Environnementale.

### 3.6. Les biomarqueurs de la dysfonction entérique environnementale

#### Taille des villosités

Les enfants atteints de SK présentent une **diminution de la taille des villosités** intestinales suggérant une diminution de la surface d'absorption des nutriments (182). De plus, une diminution de la surface de l'épithélium, des lésions histologiques, une diminution plus prononcée de l'expression protéique de claudine-4 sur des biopsies de l'intestin grêle ont été décrites dans une étude en Zambie chez des enfants MAS avec DEE (180,183). Cependant, ces études n'ont pas observé de modulation de la taille des villosités ou des cryptes (180,183). Plus récemment, en présence de diarrhée, des villosités plus courtes ont été mises en évidence chez des enfants MAS (181). Ce résultat est corrélé positivement avec l'augmentation des taux de « Lipopolysaccharides Binding protein », marqueur de la translocation bactérienne (181). La DEE se caractérise par une infiltration lymphocytaire et d'hématies dans la *lamina propria* suggérant une inflammation intestinale

(145,184). Comme le recueil de biopsies intestinales est toutefois invasive, d'autres marqueurs ont été proposés pour le diagnostic de la DEE.

#### Biomarqueurs de la perméabilité intestinale

Parmi les biomarqueurs de la DEE, le **test au lactulose : mannitol** (ou L :M test) est le biomarqueur le plus connu (185–187). Ce test repose sur le principe de l'absorption différentielle de 2 sucres. En effet, le lactulose et le mannitol sont des sucres non métabolisables dans le tractus digestif (188). En premier lieu, le lactulose est un disaccharide à haut poids moléculaire (342 g/mol), marqueur de la perméabilité paracellulaire (189). Quant au mannitol, il s'agit d'un monosaccharide de petit poids moléculaire (182 g/mol) et est un marqueur de la perméabilité transcellulaire (189). Les patients ayant une atteinte de l'intégrité de la barrière intestinale ont une perméabilité paracellulaire plus importante au lactulose augmentant le rapport L :M (190). Ce test a été la première fois utilisé dans le contexte de la dénutrition infantile par *Lunn et al.* en Gambie et ce paramètre est corrélé positivement avec le retard de croissance (146). *Weisz et al.* au Malawi a observé le même phénomène (155). Dans une étude en Zambie, les enfants atteints de MAS présentent également une augmentation de ce ratio associé avec les diarrhées persistantes et le retard de croissance staturo-pondéral (181).

L'augmentation de la perméabilité intestinale peut être également mise en évidence par une perte protéique directement dans la lumière intestinale. Cette perte peut être caractérisée par une augmentation des **taux fécaux d' $\alpha$ -1-anti-trypsine ( $\alpha$ 1AT)**.  $\alpha$ 1AT est une glycoprotéine endogène présente normalement dans le sérum à une concentration de 1,9 à 5 g/L. Elle n'est normalement pas présente dans la nourriture et possède un poids moléculaire similaire à l'albumine. Cet inhibiteur de protéase est résistant à la dégradation par les protéases intestinale et n'est ni sécrétée, ni absorbée de façon active par l'intestin grêle (191). L' $\alpha$ 1AT a été récemment mesurée dans l'étude MAL-ED montrant une corrélation positive avec le retard de croissance linéaire (192). La mesure de l' $\alpha$ 1AT n'est pas spécifique à la DEE puisque sa concentration peut être élevée suite à une infection du tractus intestinal (*eg.*, *Shigella* ou autres espèce invasives) (193).

La **citrullinémie** plasmatique permet de mesurer la fonction intestinale et la masse métabolique fonctionnelle entérocytaire dans les maladies telles que la maladie de Crohn et le syndrome du grêle court (194,195). Dans le cadre de la MA, des données récentes ont montré chez des enfants MAM au Mali que la citrullinémie plasmatique était corrélée positivement avec le rapport poids pour taille et le périmètre brachial au cours d'une réhabilitation nutritionnelle suggérant une amélioration de la fonction entérocytaire (196).

## Biomarqueurs de l'inflammation

L'inflammation intestinale peut être déterminée par le **dosage de cytokines sériques**. *Petri et al.* ont mis en évidence une association entre les cytokines pro-inflammatoires sériques détectées dans une cohorte prospective d'enfants atteints de dénutrition au Bangladesh et les troubles du neurodéveloppement caractérisés par un déficit moteur (147). Les auteurs montrent une augmentation des taux de cytokines comme IL-1 $\beta$  et IL-6 significativement associées au déficit moteur (197). De plus, ils ont mis en évidence qu'une augmentation d'IL-4 était corrélée à un meilleur score cognitif (197).

**La calprotectine** est sécrétée par des neutrophiles et monocytes activés ou par des cellules lysées (198) et sa concentration fécale est étudiée comme marqueur non-invasif de l'inflammation intestinale. *Attia et al.* ont montré que les taux de calprotectine chez l'enfant dénutri étaient corrélés avec la mortalité (9). De plus, une étude clinique prospective récente a mis en évidence une augmentation des taux de calprotectine fécale chez des enfants atteints d'infection entérique (163). Ces deux entités étaient corrélées significativement avec un retard de croissance (163). Au Bangladesh, une autre étude prospective a montré que 80% des enfants atteints de DEE présentaient une augmentation de la production en calprotectine fécale corrélée avec une mauvaise réponse vaccinale (148). Dans une étude réalisée au Malawi, la prise en charge nutritionnelle des enfants MAS a permis une diminution du taux de calprotectine fécale (199). Une étude au Bangladesh a montré une augmentation plus importante des taux de calprotectine fécale chez les enfants ayant développé une prolifération bactérienne intestinale (157).

**La myéloperoxydase (MPO)** est une enzyme produite par les neutrophiles (200) dont l'activité reflète le nombre de neutrophiles dans des modèles d'inflammation intestinale (201,202). Dans le cadre de la dénutrition infantile avec DEE, l'étude MAL-ED a mis en évidence une augmentation des taux de MPO fécale chez des enfants dénutris avec retard de croissance et plus particulièrement chez ceux infectés par des bactéries entéroaggrégatives (138).

Comme la translocation bactérienne participe à la pathogenèse de la DEE, des biomarqueurs comme la **néoptérine fécale**, (ii) la concentration plasmatique en **lipopolysaccharides (LPS)** et (iii) les **anticorps anti-Flagelline** peuvent également être utilisés.

**La néoptérine** est un produit du catabolisme synthétisé par des macrophages activés. Une étude en Gambie a démontré que les taux fécaux de néoptérine étaient inversement associés au poids et à la taille des enfants dénutris (152). En Zambie, une augmentation des taux de LPS plasmatiques a été mesurée chez des enfants atteints de MAS avec DEE suggérant une augmentation de la perméabilité intestinale (180). Des études préliminaires ont mis en évidence chez des enfants à risque de DEE en

Tanzanie une relation entre le retard de croissance et l'augmentation des taux sériques des **immunoglobulines anti-flagelline** et **anti-LPS** par rapport à des enfants sans retard de croissance à Boston (196). L'augmentation des taux d'IgA et IgG anti-Flagelline et anti-LPS à l'âge de 6 mois sont également associés à une augmentation du risque de perte de poids (196).

Pour conclure, la DEE se caractérise par une augmentation de la perméabilité et de l'inflammation intestinale, une diminution de la taille des villosités et une malabsorption des nutriments. Les causes de la DEE impliqueraient les infections entériques ou le développement d'une dysbiose dans les zones contaminées des pays à faibles revenus ou à revenus intermédiaires. Elle serait responsable (i) du développement d'un cercle vicieux aggravant l'état de dénutrition de l'enfant et (ii) d'une diminution de l'efficacité des traitements nutritionnels en raison de la malabsorption intestinale développée. Aujourd'hui, afin de mieux comprendre les mécanismes de la DEE, des modèles précliniques ont été développés et sont décrits dans la littérature. Afin de les présenter, nous avons rédigé une revue de la littérature présentée dans le chapitre 2.



## À retenir

La dysfonction entérique environnementale se caractérise par une augmentation de la perméabilité intestinale, une inflammation de bas grade, une infiltration leucocytaire dans la *lamina propria*, une diminution de la taille des villosités et une malabsorption des nutriments.

L'étiologie de cette dysfonction serait environnementale et impliquerait l'exposition à des microorganismes pathogènes entériques menant soit à une dysbiose, soit à une infection entérique chronique.

Afin de diagnostiquer la DEE, des études histologiques à partir de biopsies intestinales ont permis de mettre en évidence une infiltration leucocytaire et une diminution de la taille des villosités intestinales. En raison du caractère invasif du prélèvement de biopsies en particulier chez l'enfant, d'autres biomarqueurs de l'inflammation ont été mesurés tels que la calprotectine, l'activité myéloperoxydase ou encore la néoptérine. La perméabilité intestinale est généralement étudiée par le test du lactulose – mannitol.

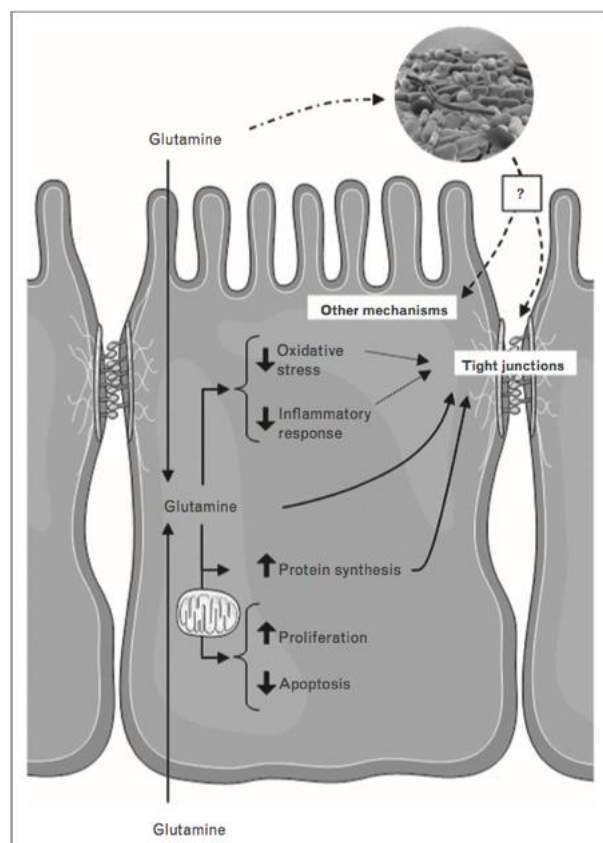
L'entéropathie aggraverait l'état de dénutrition chez l'enfant entraînant alors un cercle vicieux. La DEE serait également un frein à la phase de stabilisation. Améliorer la fonction de barrière serait une piste thérapeutique afin d'améliorer et de renforcer l'efficacité des traitements.

#### 4. Les modèles de dénutrition avec entéropathie

Dans la littérature, des modèles précliniques de dénutrition sont décrits chez l'animal. Les modèles de dénutrition induite par une restriction calorique, un régime isocalorique faible en protéines ou par une dénutrition *in utero* permettent de développer un retard de croissance staturo-pondéral ne non pas nécessairement associés à une DEE. Des modèles de dénutrition associés à une infection bactérienne permettent de développer ces deux paramètres mais l'inflammation engendrée est souvent très augmentée. Les lipopolysaccharides, le lactose ou encore l'indométacine sont utilisés dans des modèles animaux d'entéropathie.

Ce chapitre sera développé sous la forme d'une revue de la littérature dans le chapitre 2.

Les modèles précliniques peuvent être utilisés afin d'évaluer les effets de nutriments sur la fonction de barrière. Certains de ces nutriments sont présentés dans le chapitre suivant.



**Figure 11: Effets de la glutamine sur la fonction de barrière intestinale**

La glutamine est un acide aminé conditionnellement essentiel participant au maintien de la fonction de barrière intestinale. Sa déplétion induit une atrophie villositaire, une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité intestinale dans des modèles animaux. Une supplémentation en glutamine renforce la fonction de barrière intestinale en diminuant l'inflammation et la perméabilité intestinale. La glutamine diminue le stress oxydant et l'apoptose cellulaire. Elle induit également une augmentation la synthèse protéique et la prolifération cellulaire.

*D'après Achamrah et al 2018.*

## 5. Effets des nutriments sur la fonction de barrière intestinale

Le lait thérapeutique F-75 est utilisé durant la phase 1 de stabilisation nutritionnelle (2). Dans le but d'optimiser ce produit, nous avons souhaité enrichir le lait thérapeutique F-75 avec de la glutamine et de la leucine puis, dans un second temps, de la gomme arabique et/ou levures sélénées connus pour améliorer la fonction de barrière intestinale.

### 5.1. La glutamine

La glutamine (Gln) est un acide aminé conditionnellement essentiel et notre laboratoire comme d'autres ont démontré ses effets bénéfiques sur la barrière intestinale et sur la régulation de l'inflammation (203–207) (Figure 11). La Gln est également le nutriment préférentiel des cellules à division rapide comme les entérocytes ou les cellules immunitaires (208).

#### 5.1.1. La glutamine améliore la fonction de barrière intestinale

##### *La glutamine permet la restauration de l'intégrité de la barrière intestinale*

Dans un modèle de mucite induite par méthotrexate chez le rat, la Gln permet d'améliorer la fonction de barrière intestinale caractérisée par (i) une augmentation de la taille des villosités, (ii) une diminution de la perméabilité intestinale, (iii) une augmentation de l'expression protéique de claudine-1 et de l'occludine (205). La Gln et le glutathion induisent une augmentation de la hauteur des villosité mais n'a pas d'effet préventif sur la translocation bactérienne dans ce modèle préclinique (206). La Gln permet la restauration de l'expression de la claudine-1 dans un modèle expérimental de syndrome de l'intestin irritable (204).

Un prétraitement avec de la Gln permet une augmentation de la taille du colon et une augmentation de l'expression en ARNm codant pour Mucine-2 (MUC-2) et Trefoil Factor 3 (TFF-3), composants du mucus, dans un modèle de colite chimio-induite (209).

##### *La glutamine diminue l'inflammation intestinale*

Un traitement par la Gln diminue les taux de cytokines pro-inflammatoires de biopsies duodénales telles qu'IL-6 and IL-8 *in vitro* et *in vivo* (210). Une diminution de la production *in vitro* d'IL1- $\beta$  a été mise en évidence dans des biopsies duodénales de patients en présence de doses croissante de Gln (211). De plus, dans un modèle de privation maternelle chez le rat nouveau-né, la Gln a permis la restauration de l'expression des Toll-like receptor 4 (TLR4), acteur de l'activation de l'immunité innée (212). Dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), la Gln induite une diminution de la production de NF $\kappa$ B et p38 (pro-inflammatoire) dans des biopsies de colon de patients atteints de la maladie de Crohn *in vitro* (213). Des effets anti-infectieux ont également été mis en évidence. Dans un modèle de dénutrition combiné à une infection par

*Cryptosporidium parvum*, l'alanyl-glutamine permet de diminuer la perte de poids corporel chez la souris et l'infectiosité du parasite (12). *In vitro*, la déprivation en Gln exacerbe la production d'IL-8 par des cellules épithéliales intestinales H4 par le biais de l'activation de NFκB (214) alors qu'un prétraitement avec de la Gln réduit sa production dans des cellules HCT-8 (207).

#### 5.1.2. Impact de la glutamine sur l'absorption intestinale

Dans une étude clinique, une solution de réhydratation supplémentée en Gln induit une meilleure réabsorption de l'eau et du sodium jéjunale dans le cas d'une hypersécrétion induite par une infusion de prostaglandines E1 (215). Dans une étude clinique, la perfusion jéjunale en Gln, associée au glucose, a également permis d'augmenter l'absorption nette d'eau dans le jéjunum et une diminution de la sécrétion de sodium chez des patients atteints de choléra (216). Ceci a également été mis en évidence dans un modèle de diarrhée induite par la toxine du choléra chez le lapin ayant reçu une solution de réhydratation enrichie en Gln (217). Des études *in vitro* ont démontré que la Gln était capable de stimuler l'absorption du sodium à travers l'iléon de lapin en chambre de Ussing (218,219). Cette augmentation de l'absorption du sodium expliquerait l'augmentation de l'absorption de l'eau au niveau de l'intestin.

#### 5.1.3. La glutamine induit la synthèse protéique

La Gln possède également des effets bénéfiques sur la synthèse protéique. En effet, elle favorise le maintien de l'intégrité de la barrière en améliorant le métabolisme protéique. Ce mécanisme est en effet très important pour l'homéostasie de l'intestin car le taux de synthèse protéique fractionnaire dans ce tissu est élevé (50% par jour dans le duodénum) comparé à d'autres tissus de l'organisme (220). *In vitro*, la déplétion de Gln inhibe le métabolisme protéique de cellules Caco-2 en diminuant le taux de synthèse protéique fractionnaire (221). Le même résultat a été montré en utilisant des cellules HCT-8 avec une diminution de l'expression de 4E-BP1 impliquée dans l'activation de la voie mTOR et donc de la synthèse protéique (203). Dans cette dernière étude, il a été suggéré que la maintenance de la synthèse protéique était nécessaire pour sécuriser les protéines de jonction serrées puisque l'absence de Gln induit une diminution la résistance transépithéliale suggérant une augmentation de la perméabilité transcellulaire (203).

#### 5.1.4. La glutamine impact la composition du microbiote intestinal.

La Gln aurait également un impact sur le microbiote intestinal. Chez la souris, deux semaines de supplémentation en Gln (1%) du régime alimentaire est associée à une modification de la population bactérienne plus particulièrement une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* (222). Chez des patients en surpoids ou obèse, la supplémentation en Gln (30g/jour) pendant deux semaines modifie la composition du microbiote en diminuant également le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* (223).

## 5.2. La leucine

Comme la valine et l'isoleucine, la leucine (Leu) est un acide aminé essentiel faisant partie de la famille des acides aminés branchés (Branched Chain Fatty Acids - BCAA).

Nous nous sommes intéressés à cet acide aminé pour son effet sur la synthèse protéique. En effet, des études dans un modèle porcin ont démontré que la Leu est un substrat très important pour la synthèse protéique mais aussi une molécule impliquée dans la stimulation de cette synthèse notamment chez les nouveaux nés (224). La supplémentation en Leu induit une stimulation de la synthèse protéique suite à l'activation de la voie mTOR chez le porcelet (225). La Leu est également capable d'atténuer la cascade de signalisation des lysosomes spécifiques de l'autophagie au niveau des muscles squelettiques jouant un rôle dans la dégradation de la masse musculaire (225). Cette synthèse protéique s'illustrerait par une meilleure croissance pondérale des porcelets nouveau-nés entre le 7<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour (226). En revanche, dans un modèle de dénutrition protéino-énergétique ou calorie-énergétique, la supplémentation en Leu dans ces régimes active bien la cascade de signalisation de la voie mTOR sans pour autant améliorer la prise de poids ou la synthèse de protéines musculaires chez le porcelet (225). Plus récemment, *Manjarin et al.* n'ont pas mis en évidence d'amélioration de ce paramètre après trois semaines de traitement (227). Ces résultats suggèrent que la dénutrition entrave la prise de masse musculaire bien que la voie de la synthèse protéique musculaire soit activée. De plus, la masse musculaire du gastroctémus, du soléus et de l'extenseur étaient significativement réduites chez le rat au bout de 4 semaines de restriction calorique (-50%) (228). Ces groupes ont ensuite reçu un régime standard supplémenté avec une faible ou haute dose de Leu durant deux semaines (228). Dans cette étude, la supplémentation en Leu a amélioré la résistance à l'hormone de croissance mise en évidence par une diminution de la production de GH sans pour autant rattraper le poids des rats du groupe contrôle (228). Cependant, cette supplémentation a permis la prise de masse musculaire dans ce modèle (228).

Au niveau intestinal, la Leu (i) stimule la synthèse protéique intestinale (via l'activation de la voie mTOR), (ii) inhibe la protéolyse (208) et (iii) augmente la synthèse protéique intestinale (229). Dans un modèle de dénutrition protéique chez le porcelet, la Leu améliore la taille des villosités de l'intestin grêle (230). Dans une étude chez les porcelets nouveaux-nés, la supplémentation entérale en Leu (1.4g Leu/kg pendant 14 jours) a permis d'augmenter la taille des villosités uniquement dans le duodénum suggérant un effet bénéfique sur la prolifération des entérocytes (226). Cette étude montre également une diminution de la profondeur des cryptes dans l'iléon pouvant s'expliquer par une augmentation de la migration des cellules épithéliales via l'activation de la voie mTOR (231). De plus, dans cette étude, un nombre important de transporteurs de la Leu ont été identifiés sur la surface apicale. Parmi eux, les ARNm codant pour SLC6A14, SLC6A19 et SLC6A9 sont augmentés au

niveau du jéjunum suggérant une amélioration de l'absorption intestinale faisant de la Leu un substrat intéressant pour améliorer l'absorption des nutriments (226).

### 5.3. La gomme arabique

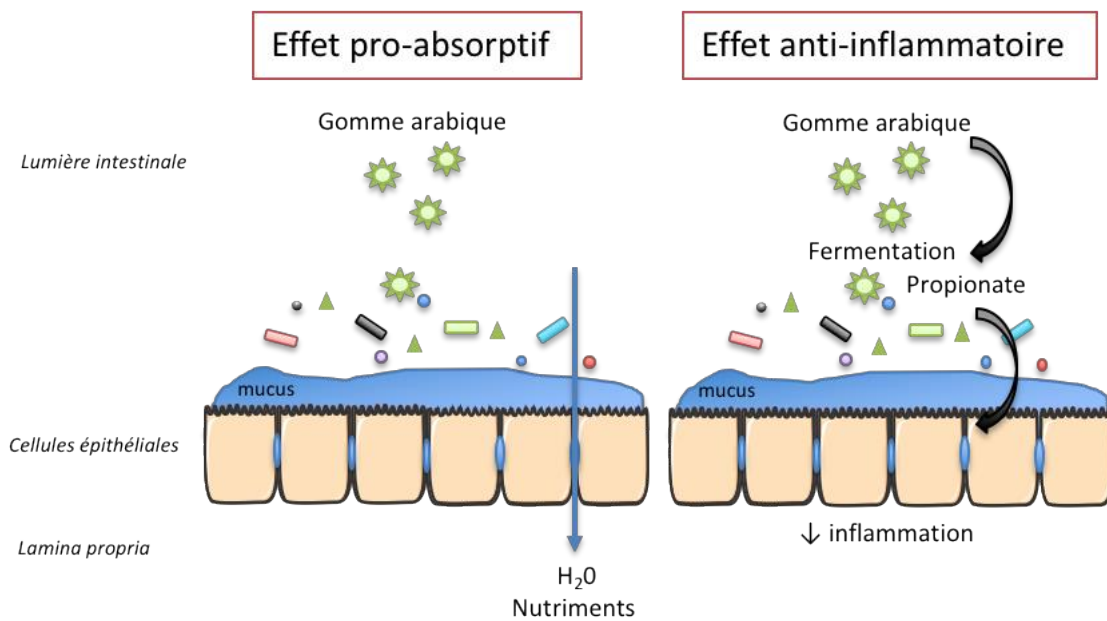
La gomme arabique (GA) est un polysaccharide acide ramifié composé de galactose, rhamnose, arabinose et d'acide glucuronique (232). La GA est un exsudat naturellement produit au niveau des troncs d'arbres ou pieds d'arbre du genre *Acacia*. Nous décrirons par la suite les effets bénéfiques de la GA mis en évidence dans la littérature scientifique.

#### 5.3.1. La gomme arabique améliore l'absorption intestinale

Des études chez l'animal ont mis en évidence une amélioration de l'absorption intestinale du sodium chez le rat suite à l'ingestion de gomme arabique (233,234). Chez rat, la supplémentation en GA (5 et 10g/L) d'une solution de réhydratation (60nM ou 90nM de sodium) infusée dans la lumière intestinale induit une augmentation de l'absorption du sodium (235). Cette meilleure réabsorption du sodium a également été mise en évidence dans un modèle de diarrhée chez le rat (234). L'addition de GA (10g/L) dans la solution de réhydratation directement perfusée dans le jéjunum a permis d'augmenter d'un facteur 2 l'absorption de sodium, de potassium et d'eau dans le premier modèle alors que dans la seconde expérience, la GA a bloqué l'action de la théophylline (234). Cet effet positif a également été mis en évidence par *Teichberg et al.* avec une diminution de la durée des épisodes diarrhéiques dans un modèle de diarrhée chronique (236,237). Dans ce cadre, la GA a permis, une meilleure réabsorption des nutriments pouvant expliquer une meilleure reprise de poids dans ce modèle (236). Comme les fluides sont également mieux absorbés, l'incidence des diarrhées diminuent 4h à 24h après l'administration de GA (237). L'amélioration de la réabsorption des ions chlorures et du sodium a également été observée dans un modèle de rat perfusé avec des toxines de choléra sous anesthésie (238). La GA semble donc aussi efficace que son mode d'administration soit *per os* ou directement perfusée dans l'intestin grêle (234–237,239–241).

La GA exerce un effet proabsorptif en modulant le niveau des radicaux libres de monoxyde d'azote (NO) produite par les entérocytes dans la partie haute de l'intestin en le piégeant dans la lumière intestinale (240) ou bien en inhibant la NO synthase inductible (iNOS) (242). La NO inhibe la capacité de transport de l'eau et des électrolytes en activant la guanylate cyclase (243). La suppression de NO de la lumière intestinale pourrait donc être partiellement responsable des effets anti-sécrétoires de la GA.





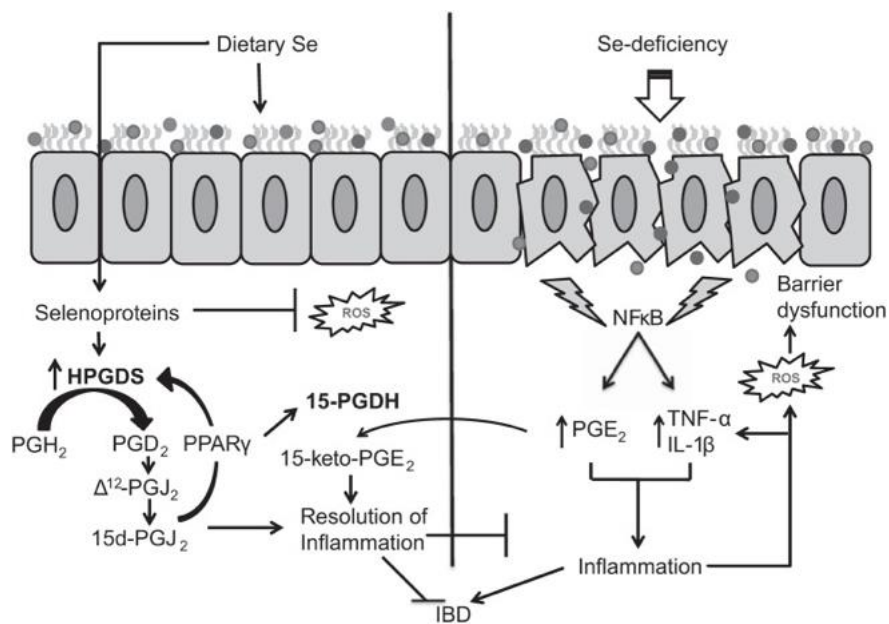
**Figure 12: Schéma résumant l'effet de la gomme arabique sur la fonction de barrière intestinale**

La gomme arabique a des effets pro-absorptifs caractérisés par une meilleure réabsorption du sodium, de l'eau et des nutriments. De plus, la gomme arabique est fermentée par le microbiote intestinal en AGCC en particulier le propionate. Or, les AGCC possèdent des propriétés anti-inflammatoires au niveau intestinal. AGCC : Acide Gras à Chaine Courte.

### 5.3.2. La gomme arabique et ses effets prébiotiques

Des études ont également montré un effet prébiotique du GA. En effet, *Wyatt et al.* montrent une augmentation du nombre de *Bacteroidetes* et de *Bifidobacterium* dans les fécès de volontaires après la consommation de dix grammes de GA pendant 18 jours (244). *Cherbut et al.* ont également observé une augmentation du nombre de bifidobactéries dans les fécès de volontaires ayant reçu quinze grammes de GA durant dix jours (245).

La GA n'est pas dégradée dans l'estomac et dans l'intestin grêle. En effet, il a été montré une fermentation complète de la GA dans le caecum chez le rat (246,247) et dans le colon chez l'Homme (232). Cette fermentation active la prolifération bactérienne (248) ce qui engendre une augmentation de la production des AGCC (249). L'incorporation de GA dans un régime pauvre en fibres induit une augmentation du poids de la paroi du *caecum* ou une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales de cette paroi (250). Cette hypertrophie augmente la surface absorbative de la muqueuse et augmente le flux sanguin caecal chez le rat (251). Les AGCC tels que l'acétate, le butyrate et plus particulièrement le propionate sont produits de la fermentation de la GA par le microbiote intestinal chez le rat (248,251,252). *Prevotella ruminicola* serait majoritairement responsable de la fermentation du GA en propionate dans le caecum de porcelet (253). Cette espèce a également été isolée à partir du microbiote du colon humain (254) De plus, la GA a des propriétés anti-infectieuses. Une supplémentation de l'eau de boisson par 10% de GA diminue l'infectiosité de souris infectées par la Malaria (255)(Figure 12).



**Figure 13: Effet du sélénium l'amélioration des paramètres inflammatoires de l'intestin**

Le sélénium est un élément trace, présent dans la sélénocystéine composant les sélénoprotéines. Une déficience en Se entraîne une cascade pro-inflammatoire via l'activation de la voie NF-κB. A l'inverse, une supplémentation en Se réduit le stress oxydant et l'inflammation intestinale. Se : sélénium.

*D'après Kudva et al 2015.*

#### 5.4. Le sélénium

Le sélénium (Se) est un élément trace essentiel incorporé dans un acide aminé appelé la sélénocystéine pouvant être incorporé aux protéines appelées sélénoprotéines dont 25 ont été identifiées : 4 isoformes de glutathion peroxydases, 2 isoformes de thiorédoxines réductases, 3 isoformes des iodothyronine 5' déiodinases, les sélénophosphates synthases, les sélénoprotéines P, W et Sep15 (256).

##### 5.4.1. La carence en sélénium chez les enfants atteints de malnutrition aiguë sévère

Plusieurs études cliniques indiquent une diminution des taux de Se plasmatique chez les enfants atteints de MAS (257–260) La déficience en Se a été rapporté comme facteur d'incidence du développement d'infection. En effet, il a été montré chez la souris que la carence en Se s'accompagne d'une altération de l'immuno-compétence en favorisant la survenue, la virulence ou encore la progression de certaines infections virales telle que le virus Cocsackie B3 (261). La carence en Se induit une diminution de l'activité de la glutathion peroxydase induisant une augmentation du stress oxydatif favorisant la virulence des virus (262).

##### 5.4.2. Propriétés anti-inflammatoires du sélénium

Nous nous intéressons à la supplémentation en Se pour ses effets anti-inflammatoires (Figure 13). Dans un modèle de colite chimio-induite, la supplémentation en Se (0.4 ppm de sélénite de sodium) diminue les marqueurs d'activation des macrophages (Tnf $\alpha$ , Ifn $\gamma$  et Il1 $\beta$ ) et augmente ceux des macrophages inactivés (IL-10, Fizz-1 et Arg-1) dans le colon (263). Le Se induit une inhibition *in vitro* de la voie NF $\kappa$ B dans des macrophages RAW264.7 (264). L'inhibition de la voie NF $\kappa$ B par le Se permet d'inhiber l'acétylation des protéines nucléaires et d'empêcher ainsi l'action de l'acétyltransférase p300 responsable de la transcription de gènes codants pour des protéines pro-inflammatoires, par les macrophages (265,266). La supplémentation en sélénite de sodium (0.6ppm) à court terme n'a pas d'effet sur un modèle de colite induite chimio-induite chez la souris alors que la supplémentation en sélénométhionine à la même dose prévient l'inflammation (267). Cela suggère ainsi l'action directe, non pas du sélénium, mais des sélénoprotéines sur l'inflammation.

##### 5.4.3. Sélénium et retard cognitif

La supplémentation en Se d'un régime pauvre en protéines pendant trois semaines induit une diminution centrale du stress oxydant en diminuant les taux d'espèces réactive à l'oxygène (ROS) au niveau mitochondrial chez le rat (268).

#### 5.4.4. Biodisponibilité du sélénium et choix de la levure enrichie en sélénium

Dans le lait thérapeutique F-75, le Se est présent sous sa forme chimique : le sélénite de sodium à 1,5%. Dans notre étude 3, nous avons choisi de compléter le lait thérapeutique F-75 avec de la levure sélénée. En effet, le Se sous sa forme chimique est moins bien assimilé par l'organisme par rapport au Se en provenance de levures sélénées *in vitro* (269).

L'utilisation de levures sélénées permet également de bénéficier de l'effet probiotique médié par *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure possède (i) des effets antibactériens (270–272) (ii) un effet protecteur contre l'inflammation intestinale notamment dans des modèles de colites (273) et de mucosites (274). Dans un modèle de mucosite chez la souris, le gavage préventif de *S. cerevisiae* seul a permis de diminuer (i) la perméabilité intestinale, (ii) l'activité MPO, (iii) le score histopathologique et (iv) et le stress oxydant (275). De plus, l'adjonction de Se dans cette souche bactérienne permet d'améliorer son effet probiotique en réduisant l'activité peroxydase des éosinophiles (275). De plus, la levure sélénée associée à la GA diminue de façon plus importante l'inflammation hépatique dans un modèle chronique d'hépatite induite par le tétrachlorure de carbone chez le rat (276).

## À retenir

Afin d'améliorer la fonction de barrière intestinale, plusieurs nutriments ont été sélectionnés pour enrichir la formule du lait thérapeutique F-75.

Dans des études cliniques et précliniques, la supplémentation en glutamine améliore la fonction de barrière intestinale en diminuant l'inflammation et la perméabilité intestinale alors que la leucine permet une augmentation de la synthèse protéique.

Dans des études expérimentales, la gomme arabique améliore l'absorption de l'eau dans des modèles de diarrhée. La gomme arabique est également un prébiotique qui fermente sous l'action du microbiote intestinal pour être métabolisée en AGCC, en particulier en propionate, pouvant avoir des effets anti-inflammatoires.

Les taux plasmatiques de sélénium sont diminués chez les enfants atteints de MAS. Dans des modèles précliniques, la carence en sélénium induit une immunodéficiência favorisant l'infectiosité de bactéries ou de virus. Enfin, la supplémentation en sélénium induit une diminution de l'inflammation intestinale dans des modèles murins de colite. Comme la biodisponibilité du sélénium sous la forme de levure enrichie est supérieure à celle sous la forme de sélénite de sodium, nous avons privilégié les levures séléniées comme *Saccharomyces cerevisiae*. Ces levures présentent des effets probiotiques comme une amélioration de la perméabilité intestinale et de l'inflammation ainsi qu'une diminution du stress oxydant.



## Chapitre 2 – Travaux de thèse

### 1. Justification

La malnutrition aiguë sévère (MAS) est un problème majeur de santé publique dans le monde touchant plus de 17 millions d'enfants âgés de moins de 5 ans plus particulièrement dans les pays à faibles revenus et à revenus intermédiaires. Dans le traitement de la MAS, l'Organisation Mondiale de la Santé préconise l'utilisation de traitements nutritionnels. La MAS est souvent associée à une dysfonction entérique environnementale, omniprésente dans les pays en voie de développement. Elle se caractérise par une dysfonction de barrière intestinale : (i) une hyperperméabilité intestinale, (ii) une inflammation intestinale, (iii) une diminution de la taille des villosités (iv) et une malabsorption des nutriments. La dysfonction entérique environnementale contribuerait à une mauvaise réponse aux traitements. Il y a donc un grand intérêt à restaurer la fonction de barrière chez ces enfants afin d'améliorer l'absorption des nutriments pour permettre une meilleure croissance.

### 2. Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, le projet de thèse se développe sur deux axes.

#### **Objectif 1 : Développement d'un modèle murin de dénutrition avec entéropathie**

Dans un premier temps, une revue de la littérature a été réalisée afin de discuter de différents modèles de dénutrition et leur potentiel pour développer une dysfonction entérique environnementale. Cette revue insiste sur la difficulté d'induire une dysfonction de barrière intestinale par une approche uniquement nutritionnelle en modulant la composition en macro et micronutriments. En effet, il est indispensable d'associer la dénutrition à un élément induisant l'entéropathie. La méthode la plus utilisée pour induire une entéropathie est l'infection par des microorganismes. Cependant, il est difficile de contrôler l'inflammation induite par ces infections et l'inflammation développée n'est pas toujours de bas grade. C'est pour cette raison que nous avons choisi de développer un nouveau modèle de dénutrition sévère avec dysfonction entérique environnementale en utilisant l'indométacine. La recherche bibliographique est présentée dans la « revue n°1 » soumise au journal international à comité de lecture « *Nutrients* ». Nous avons également testé différents protocoles pour développer un modèle de dénutrition associé à une



entéropathie. Les résultats de ces travaux sont décrits dans l' « Article n°1 » soumis au journal international à comité de lecture «*Journal of Nutrition*».

**Objectif 2 : Évaluation de laits thérapeutiques supplémentés en nutriments d'intérêts sur la croissance et la fonction de barrière intestinale**

Un lait thérapeutique, le F-75, est utilisé lors de la phase initiale du traitement de la MAS (ou phase de stabilisation). La composition du lait F-75 a été peu modifiée depuis plus de 20 ans. Nous proposons d'enrichir cette formule par des nutriments ciblant la fonction de barrière intestinale. Dans l'étude n°2, le lait thérapeutique a donc été supplémenté en glutamine et leucine pour leurs effets bénéfiques sur la fonction de barrière intestinale et a été évalué sur notre modèle préclinique. Les résultats de cette partie sont présentés dans l' « article n°2 » soumis au journal « *Amino Acids* ». Dans l'étude n°3, le lait thérapeutique a été enrichi avec de la gomme arabique et/ou des levures sélénées. La gomme arabique a été choisie pour ses effets prébiotiques et anti-inflammatoires et la levure sélénée pour ses effets probiotiques induisant une diminution de l'inflammation et de la perméabilité intestinale.

## Revue n°1

La malnutrition aiguë sévère affecte environ 17 millions d'enfants âgés de moins de cinq ans. Cette forme de dénutrition est associée à une dysfonction entérique environnementale (DEE), caractérisée par (i) une hyperperméabilité intestinale, (ii) une inflammation de bas grade, (iii) une diminution de la taille des villosités et (iv) une malabsorption des nutriments, pouvant entraver l'efficacité des solutions nutritives.

Nous avons discuté des avantages et des limites de l'utilisation de modèles de dénutrition induits par des régimes pauvres en protéines ou en micronutriments. La dénutrition est généralement suffisante pour induire un retard de croissance staturo-pondéral mais ne suffit pas pour induire une dysfonction entérique environnementale. Pour induire une entéropathie, la dénutrition est souvent associée à un 2<sup>ème</sup> stimulus, comme par exemple une infection par des microorganismes. Il existe également d'autres méthodes non-infectieuses pour induire une entéropathie comme l'utilisation du lactose ou de l'indométacine.



**Animal models of undernutrition and enteropathy as tools for assessment of nutritional intervention.**

**Authors list :** Emmeline Salameh<sup>1,2</sup>, Fanny B. Morel<sup>2</sup>, Mamane Zeilani<sup>2</sup>, Pierre Déchelotte<sup>1,3</sup>, Rachel Marion-Letellier<sup>1</sup>.

**Affiliations :**

1 UniRouen, Inserm UMR 1073 « Nutrition, Inflammation and Gut-Brain Axis », Normandie University, 76183, Rouen, France

2 Nutriset SAS, 76770, Malaunay, France

3 Department of Nutrition, Rouen University Hospital, 76183, Rouen, France

**Mail address**

[Emmeline.salameh@etu.univ-rouen.fr](mailto:Emmeline.salameh@etu.univ-rouen.fr)

[Fmorel@nutriset.fr](mailto:Fmorel@nutriset.fr)

[Mzeilani@nutriset.fr](mailto:Mzeilani@nutriset.fr)

[Pierre.dechelotte@chu-rouen.fr](mailto:Pierre.dechelotte@chu-rouen.fr)

[Rachel.letellier@univ-rouen.fr](mailto:Rachel.letellier@univ-rouen.fr) (Corresponding author)

## **Abstract**

Undernutrition is a major public health problem leading to 1 out of 5 all deaths in children under 5 years. Undernutrition leads to growth stunting and/or wasting and is often associated to environmental enteric dysfunction (EED). EED mechanisms leading to growth failure include intestinal hyperpermeability, villus blunting, malabsorption and gut inflammation. As noninvasive methods for investigating gut function in undernourished children are limited, pre-clinical models have been developed to elucidate the pathophysiological processes involved in EED and to identify novel therapeutic strategies. A literature search using PubMed from inception to January 2019 was performed to identify relevant studies on experimental models of undernutrition and/or enteropathy. Manuscripts published in English were selected and reviewed. In many models, undernutrition was induced using protein or micronutrient deficient diets, but these experimental models were not associated with EED. Enteropathy models mainly used gastrointestinal injury triggers such as microbial challenge or lactose. We found only few studies investigating the combination of undernutrition and enteropathy. Further developments are needed to establish an experimental model reproducing the impact of undernutrition and enteropathy on growth, intestinal hyperpermeability and inflammation that could be suitable for preclinical evaluation of innovative therapeutic intervention.

**Key Words:** Undernutrition, Environmental enteric dysfunction, enteropathy, gut barrier

## Introduction

Acute malnutrition is a major public health problem in low-income countries affecting 51 millions of children under the age of five [1]. Severe Acute Malnutrition (SAM) in children increases risk of impaired cognitive development, later chronic diseases, morbidity and mortality (12.6% of children under 5 years) [2,3]. Undernutrition is also often associated to “Environmental Enteropathy » (EE) or « Environmental Enteric Dysfunction » (EED) [4].

Indeed, an observational study in Zambia showed that EED in SAM children with diarrhea was characterized by villus blunting, suggesting a lower nutrient absorptive area in small intestine [5]. Later, the same investigator reported higher leucocyte infiltration in addition to villus blunting in this condition [6]. Intestinal permeability, assessed by lactulose:mannitol ratio, was also inversely correlated with villus height [6]. These data suggest that SAM children may develop EED and therefore EED negatively may impact nutrients absorption. EED was associated with an altered therapeutic response and fecal calprotectin, a marker of inflammation, was related with mortality [7]. These triad, *ie* chronic intestinal inflammation, hyperpermeability and villous blunting leads to reduced nutrient uptake, affecting growth and children development [4,8] and finally leading to a vicious cycle worsening undernutrition state.

As studying gut barrier function in undernourished children is challenging, preclinical models have been developed to enable a better understanding of the mechanisms behind undernutrition and/or enteropathy. These models were also intended for the evaluation of novel therapeutics in undernutrition and/or EED. In the present review, we focused on available preclinical models of undernutrition and their effects on growth and gut barrier function. The respective advantages and limits of these models are discussed.

## 1) Undernutrition models

### a. Caloric Restriction

Limitation of food provision in caloric restriction models varies from 15 % to 50% in the literature (Table 1). Caloric restriction leads to undernutrition and has a global impact on body homeostasis. It is also associated with an impaired immune function as can be seen in undernourished children [9]. Twenty-four days of 25% caloric restriction-induced weight loss associated with thymus atrophy in BALB/C weanling mice, as a consequence of increased thymus cell apoptosis [10]. Altered cytokines production has been reported in numerous caloric restriction models: for example, a 30% caloric restriction for 14 days decreased systemic TNF $\alpha$  levels [11] while it increased the proportion of *Lactobacillus murinus* in the gut microbiota. Similarly, prolonged moderate caloric restriction (-15%) induced a lower cytokine mRNA levels of monocyte-chimioattractant protein 1 (MCP-1) in the liver and adipose tissue [12]. Lower MCP-1 level may be associated with lower triglycerides accumulation in the liver [13]. No impact of caloric restriction on intestinal permeability has however been described [13].

In addition, caloric restriction might be stressful for rodents. Accordingly, in juvenile rats fed with 25% caloric restriction plasma corticosterone levels were significantly increased [14]. Behavioral tests such as forced swimming tests or O-maze have been performed in rats with 50% caloric restriction for 32 days and exhibited increased anxiety and depression symptoms [15].

## **b. Protein-energy undernutrition**

### **i. Maternal protein-energy undernutrition.**

In the first 1000 days of life, including gestation and the first two years, children are at risk to develop short- and long-lasting consequences on their health, including undernutrition and impaired cognitive development. Indeed, a case-control study associated mother undernutrition with an increased risk of SAM in the children [16]. Pre-clinical models of fetal undernutrition have been developed and several consequences on gut barrier in the offspring have been reported (Table 1). For instance, in female offspring from undernourished pregnant rats (8% protein diet), colonic tight junction Zonula Occludens 1 mRNA expression was decreased, without impact on permeability to lipopolysaccharides (LPS), in comparison to offspring of pregnant rats receiving standard 20% diet [17]. Another study with the same level of maternal protein restriction reported an increased *ex vivo* colonic hyperpermeability to small molecule in 35 days offspring [18].

In offspring from undernourished pregnant rats (receiving a 6% protein diet), the disaccharidase activity (lactase and sucrase) was increased in different segments of the intestine [19]; this may be an adaptive process in response to maternal undernutrition to ensure a better absorption of carbohydrates, with a risk of later development of obesity as a consequence of fetal programming [19]. In another study in piglets, maternal restriction (7.3% of protein) during gestation induced lower villus/crypt ratio [20]. Lower ileal [21] and duodenal [22] villus length has also been observed in low birth weight in piglets. This reduced villus height and consequently absorptive area may contribute to offspring undernutrition.

Low inflammation has been observed in models of maternal undernutrition. Goat maternal protein restriction (60% of control diet) or energy restriction (60% of control diet) for example decreased plasma C3, C4, IgG, and IgM concentrations and jejunal *IL-2* and *IL-6* mRNA expression in offspring; this altered immune response may make the offspring more prone to bacterial infection [23]. In another study in sows, low energy diet (3.00 MCal DE/kg vs 3.40 MCal DE/kg for control diet)



was associated with higher ileal mRNA expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  in offspring [20]. Thus, the effect of protein restriction on intestinal immunity may differ in the proximal and distal intestine, but this must be confirmed in the same species. Protein-energy intrauterine undernutrition also induced anxiety-like behaviors and cognitive impairment in the offspring [24–30] which could contribute to altered feeding behaviors and to the vicious circle of undernutrition.

## ii. **Iso-caloric Protein-deficient diet**

As caloric restriction leads to stress, *ad libitum* deficient diets may be a better alternative to respect ethics for animal research. Protein-deficient diets reflect nutritional deficiencies commonly observed in undernourished children and are commonly used in the literature. While low-protein diet is isocaloric compared to standard diet, several studies demonstrated increased food intake in rodents at different protein proportion despite weight loss [31–33].

Protein-deficient diets lead to undernutrition in rodents [34,35] and are associated with gut barrier dysfunction in some conditions (Table 1). A drastic model developed by *Belmonte et al.* showed that protein-free diet impacts gut barrier function by reducing jejunal villus height leading to a decreased nutrient absorption area [36]. By contrast, in weanling mice, moderate low protein diet (7% of protein) during 3 weeks did not [34], suggesting impact of protein proportion on severity of gut barrier architecture. In the same study, this diet further induced *in vivo* gut hyperpermeability that might be explained by jejunal tight junction protein modulation as decreased ZO-1 and increased claudin-2 mRNA levels [34]. Studies in undernourished rats fed with more drastic low protein diet (4%) during 3 weeks encountered no gut hyperpermeability to large molecules while it decreased colonic and ileal transepithelial electrical resistance suggesting higher intestinal permeability to small molecules [35]. This intestinal hyperpermeability might be explained by a decreased colonic and ileal occludin protein expression [35].

Protein-deficient diets effect on inflammatory response is controversial. First, *Belmonte et al.*

did not observe any difference in plasmatic level of  $\alpha$ -1-acid glycoprotein, a major acute phase protein among control and protein-free diet fed rats [36]. Similarly, 3 weeks- LP diet (7%) decreased MCP-1 jejunal release in stool [34]. By contrast, higher inflammatory response by 2 weeks-LP diet have been also described. Indeed, LP diet (2% of protein) induced high fecal myeloperoxidase (MPO) and lipocalin 2 (LCN-2) production in weaned mice [37]. Four-weeks LP diet at 4% increased mRNA expression of cytokines such as TNF- $\alpha$ , MCP-1 and IL1- $\alpha$  into the liver [38]. LP-induced inflammation might be explained by higher susceptibility to undernourished mice to infection. Actually, a drastic weaned mice model of undernutrition (0,7% protein for 16 days) increased monocytes and macrophages number in bone marrow and blood compared to normonourished suggesting contribution of LP diet in increasing susceptibility to infectious diseases [39]. In gnotobiotic piglets transplanted with human infant fecal microbiota, low protein diet (7.5%) induced lower oral human rotavirus vaccine efficacy characterized by decreased serum TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12 responses [40]. The same conclusion has been proposed in undernourished mice fed with LP diet (2%) during 6 weeks after *Salmonella* and cholera vaccines [41]. By contrast, 1-Week LP diet (2%) in mice decreased leucocyte, peripheral lymphocyte, monocyte and polynuclear cells levels without inflammation differences compared to normonourished mice [42]. *Fock et al.* observed also leucopenia with higher systemic IL-10 production in 2-3 months aged mice fed with higher proportion of protein (4%) during 14 days [43]. Moreover, in undernourished mice from the same study, cultured cells from bone marrow, spleen and *peritoneum* with LPS *in vitro* showed lower IL-6, TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$  production [43]. In addition, lower expression of macrophage CD-4 and TLR-4/MD-2 has been observed in this group which could interfere in immune response to pathogens [43]. Lower TLR-4 expression might explain lower mRNA expression of TNF- $\alpha$  by macrophage from malnourished mice fed with LP diet (2%) and lower NF- $\kappa$ B activation after LPS challenge *in vitro* [44].

### iii. Regional diets

In LP diet previously described, minerals and vitamins proportion were adapted for rodents. In clinical settings, reduced micronutrients intake, as vitamins and minerals, is also reduced in addition to low macronutrients intake in undernourished child [45]. For this reason, specific animal diets have been formulated to mimic multiple nutrient deficiencies and to reflect local dietary pattern. Three regional diets have been used to induce undernutrition: regional basic diet from Brazil, Maize diet and Malawian diet (Table 1).

Regional Basic Diet (RBD) is an experimental rodent diet mimicking dietary pattern from NorthEast Brazilian population, characterized by reduced protein (7%), fat (8,2%), vitamins and minerals content triggering clinical symptoms such as reduced weight gain in rats [46,47], which was confirmed in later studies [48–50]. Three-weeks of this RBD in weaned mice induced jejunal hyperpermeability [48], which was related to a decreased jejunal expression of the tight junction protein claudin-3 [48]. In addition, ileal permeability was also increased despite increased ileal claudin-2 and occludin mRNA expression [49]. In contrast, after 10 days of RBD in weaned mice, ileal occludin expression was decreased without measurable impact on gut permeability [51] and jejunal villous and crypt atrophy were noted [48]. In other series in mice, 1-week RBD diet induced ileal crypt atrophy without changes in villus length while 10-days of RBD decreased villous:crypt ratio [49,51].

An early article published in 1933 in *The Lancet* and redistributed by *The Bulletin of the WHO* in 2003 stipulated that origin of Kwashiorkor syndrome, characterized by bilateral edema in undernourished children, was MAIZE diet in Ghana, a corn-based diet [52]. MAIZE diet is a diet high in carbohydrate, low in protein (6.4%), fat (3.4%) and minerals [53,54]. MAIZE diet has been developed and first studied in monkeys to induce undernutrition [55]. In this study, Kwashiorkor-like syndrome was induced in monkeys fed over 41 weeks with MAIZE diet, including growth failure, weight loss, hepatic steatosis and bilateral edema [55]. MAIZE diet has also been administered in rodents and pigs, resulting in weight loss, hepatic steatosis and shorter villi and crypts in the intestine

[53,56].

Malawian diet (M8) is a prototypic diet based on the typical Malawian diet providing eight ingredients: corn Flower, roasted peanuts, red kidney beans, pumpkin, bananas, onion tomatoes, mustard grains and water [57]. This diet does not cover the daily nutritional needs of gnotobiotic mice and led to lean body mass loss, altered bone morphology, with liver, muscles and brain altered metabolism but intestinal barrier function or inflammation was not studied [57].

#### **iv. Zinc-deficient diets**

Prevalence of zinc deficiency is very high in young children and infants in low-income countries [58]. Furthermore, protein-energy malnutrition decreased zinc small intestinal absorption in rats [59,60]. In a mice model, low zinc intake (30 $\mu$ mol/kg) during 28 days led to weight loss [61] while low zinc intake over 14 days did not affect weight [37]. Similarly, two weeks of a zinc-deficient diet did not alter intestinal villus/crypt ratio in mice [62]. Ileal permeability or plasma endotoxin concentration fed were not increased after 8 weeks of a zinc-deficient diet [63]. Interestingly, a lower villus/crypt ratio was reported when mice under a zinc-deficient diet were challenged with an entero-adhesive *E. Coli* (EAEC), which suggests a synergistic effect of infection and zinc deficiency in the development of enteropathy [62]. Two-weeks of zinc-deficient or zinc-free diet in mice did not alter inflammatory markers such as fecal LCN-2 and MPO [37,64]. In *Shigella*-infected mice, zinc-free diet prolonged *Shigella* gut colonization [64] while zinc supplementation (150 mg/L in drinking water) decreased *Shigella*-induced inflammation and enhanced weight recovery [64]. Zinc-deficient diet also decreased TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 production and ileal neutrophil infiltration which might explain the increased susceptibility to EAEC [62]. Zinc deficiency led to an altered intestinal immune response to parasitic nematodes infection in mice [65]. Mechanisms behind altered immune response involved lower production of IL-14, decreased level of IgE, IgG1, lower eosinophils and

impaired antigen-presenting cells function which enhanced parasite survival and infectivity [65].

Taking together, and despite the varying level of zinc depletion among studies, these observations suggest impaired immune response in mice fed with zinc-deficient diet which leads to increased vulnerability to pathogen infection and increased virulence (Table 1).

## **2) Enteropathy models**

Animal models of enteropathy have provided a wealth of information about gut barrier function using microbial challenges or other gastrointestinal injury.

### **a. Microbiota changes during EED and undernutrition**

The type of dysbiosis associated with child undernutrition varies according to countries [66]. For example, higher Bacteroidetes and lower Firmicutes enrichment and unusual abundance of *Prevotella* and *Xylanibacter* genus were reported in children from Rural Burkina Faso as compared to European children [66]. A Bangladeshi study reported microbiota immaturity in undernourished children and more especially in SAM children [67]. Investigators from the AFRIBIOTA consortium have described in stunted children a « decompartmentalization » of microbiota composition along the gastrointestinal tract illustrated by oropharyngeal taxa overgrowth and a higher prevalence of *Escherichia coli/Shigella* sp. and *Campylobacter* sp. [68].

Alteration of gut microbiota has been also described in experimental models of undernutrition, but discrepancies between species have to be underlined (Table 1). A three-weeks low protein diet in mice induced higher relative abundance of gram negative bacteria in the small intestine such as *Bacteroidetes*, *Enterobacteriaceae* [34]; in contrast, the RBD described above was associated with a higher proportion of *Firmicutes* [69]. Moreover, transplantation of bacterial strains targeted by IgA (IgA+ bacteria consortium) from undernourished children fecal microbiota induced small intestinal and colonic epithelial disruption into gnotobiotic mice fed with Malawi-8 diet [70]. Transplantation also triggered sepsis characterized by an increased cytokines production as IL-10, IL-

12p40, IL-1 $\beta$ , IL-6 and MCP-1 [70]. Similarly, microbiota transfer from Kwashiorkor children into gnotobiotic mice fed with Malawian diet induced weight loss, and metabolic perturbation in amino acid, carbohydrate and intermediary metabolism [71].

#### **b. Pathogen-induced enteropathy**

As described above, children exposure to environmental bacteria could play a role in the development of EED, although it has not been fully demonstrated. One mechanism may be a shift in microbe-host interaction in the intestine that might induce chronic inflammation frequently associated with undernutrition [4,72,73]. Models of EEP have been developed with different types of pathogens infection, using either protozoans (*C. parvum* or *G. Lamblia*), or bacteria.

*Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*), a parasitic invader of small intestine epithelial cells [74], is a major cause of diarrhea and gastroenteritis in children and adults worldwide [75–77]. *C. parvum* infection has a major impact on pediatric health in resource-limited countries because it increases morbidity and mortality in children [78]. Combination of undernutrition with repeated or prolonged *C. parvum* infection might be responsible for long-lasting consequences on physical and cognitive development in children [79,80]. *C. parvum* infection also contributes to the vicious cycle of undernutrition and infection by inducing nutrients malabsorption [81]. A model combining *C. parvum* infection and undernutrition in neonatal mice has been described [82]. In mice pups, undernutrition was induced by maternal separation limiting lactation time (4 hours D4 *post-partum* , 8h on D5 and 16h from D6 to D14) [82]. *C. parvum* infection on D6 induced weight loss with an additional effect in previously undernourished pups [82]. In addition, Additionally, *C. parvum* infected-undernourished pups displayed ileal villous atrophy and crypt hypertrophy and developed higher ileal inflammation reflected by increased TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  tissue levels [82]. The same team later developed another model in weaned mice combining a low (2%) protein diet with infection with *C. parvum* oocysts [83]. *C. parvum* infection in undernourished mice increased CD8+CD103+ T cells and B cells *lamina propria*

infiltration [51]. As previously reported, *C. parvum* infection exacerbated weight loss and led to decreased villous height and increased crypt depth [82,83]. A more recent study combining *C. parvum* infection with LP diet (7%) in mice over for 3 weeks also reported impaired gut barrier with a lower villi:crypt ratio and a lower ileal occludin protein expression while other tight junction proteins were not affected [51]. Two-weeks of low protein diet (2%) in *C. parvum*-infected mice also induced intestinal inflammation with higher fecal LCN-2 and higher MPO activity [84].

*Giardia* is a non-invasive enteropathogen affecting the proximal small intestine and leading to acute watery diarrhea [85–88]. Thus, its potential implication in the occurrence of enteropathy has been also investigated. *Giardia* infection led to a disrupted villus architecture and was associated with a higher lactulose:mannitol ratio, indicating increased intestinal permeability [89]. These features may contribute to nutrients uptake deficiency and gut barrier dysfunction [89–91]. A murine model combining a protein deficient (3%) diet with *Giardia Lamblia* infection demonstrated decreased nutrient absorption [92]. Undernourished weaning mice infected with *Giardia muris* developed small intestinal injury, villus atrophy and brush border duodenal and jejunal enzymatic depletion [93]. *Giardia lamblia* cultures from symptomatic and asymptomatic children inoculated in axenic Gerbils (*Meriones unguiculatus*) both induced growth retardation suggesting that silent enteric dysfunction caused by the pathogen could already impair growth [94]. Besides its effects on weight loss, *Giardia* infection also induced gut barrier dysfunction [95,96]: at D11 post infection, severely damaged villi, increased lymphonuclear cells *lamina propria* infiltration and severe ileitis were observed [96]. In weaned undernourished gerbils, persistent *Giardia Lambia* infection induced crypt hyperplasia without villus blunting associated with eosinophils infiltration of villus and crypt units [97]. Yet, the pertinence of using *Giardia* as an EED trigger has been debated. Indeed, observational studies in Malawi suggested links between mortality and systemic and intestinal infection in SAM children with diarrhea, but did not find an association between the intestinal

presence of *Giardia* and mortality or diarrhea evolution [7]. Similarly, investigators of the MAL-ED network observed that the number of *Giardia* pathogens was higher in non-diarrheal stools [98], while a meta-analysis of 12 longitudinal acute diarrhea studies did not find an association with *Giardia* [99]. Finally, *Giardia* infection was negatively correlated with linear growth during the first 2 years in the “Malnutrition and Enteric Disease” (MAL-ED) studies; in contrast, fecal MPO or neopterin were not increased in non-diarrheal stools [100,101].

In conclusion, both *C. Parvum* and *Giardia* may induce some features of enteropathy in models of undernutrition which are summarized in Figure 1.

In the model described by *Brown et al.*, a protein-deficient diet was combined with oral exposure to commensal Bacteroidetes and *E. coli* in mice. After induction, weight loss was associated with increased intestinal permeability and villus and crypt atrophy [34]; in addition, *ex vivo* jejunal cytokine release (IL-6 and MCP-1) was increased [34]. Furthermore, acute inflammation induced by bacterial challenge may be too severe in comparison to the subclinical conditions observed during EED. Thus, non-infectious models might be a good alternative to induced controlled and reproducible inflammation and gut epithelial dysfunction.

### **c. Lactose-induced enteropathy**

In undernourished children, mortality related to diarrhea is frequent [102]. In some undernourished children, secondary lactase deficiency may induce osmotic diarrhea as a consequence of lactose malabsorption [103]. This provides rationale for limiting lactose intake at the early stage of refeeding. Accordingly, lactose overload could be used to induce enteropathy in rodents (Figure 1). High amount of lactose added to the diet for 7 days induced diarrhea in rats associated with goblet cells hyperplasia and polymorphonuclear cell infiltration along the ileum,



caecum and colon [104]. In undernourished rats with RBD diet, provision of a saturated lactose solution (30g/kg) during 7 days led to osmotic diarrhea and weight loss [50,105]. Undernourished rats with diarrhea presented increased jejunal inflammation [106]; in the same study, higher bacterial translocation and a higher number of goblet cells were also indicative of gut barrier dysfunction [106]. Another study in rats fed with lactose reported loss of colon microvilli and increased number of goblet cells [105]. In contrast, a modest (5%) lactose supplementation of the diet for 4 weeks did not alter protein and mucin content in intestinal mucosa or MUC2, MUC4 gene expression [107]. Of note, use of lactose as an enteropathy trigger in preclinical models precludes the subsequent evaluation of therapeutic solutions containing high amounts of lactose. Finally, this kind of lactose-induced enteropathy is unlikely to occur in the clinical setting which limits the clinical relevance of this model.

#### **d. LPS-induced enteropathy**

Lipopolysaccharides (LPS) are lipid-based component of the outer membrane of gram-negative bacteria as *Escherichia coli* or *Salmonella enterica* [108]. LPS induced inflammation after binding to CD14 and Toll-like receptor and activation of transcription factors as NF- $\kappa$ B [109]. LPS has been used in undernourished animals (Figure 1). Combining in weanling rats undernutrition induced by a low-protein diet (5% of protein) for 2 weeks with intraperitoneal injection of LPS (2mg/kg) twice a week resulted in impaired glucose clearance and insulin secretory response [110]. In another study, low-protein diet (4%) for 2 weeks in combination with intravenous LPS induced leucopenia and severe depletion in bone marrow, spleen and peritoneal cavity cellularity 24h later [43]. LPS injection also triggered lower IL-1 $\beta$  levels in blood, spleen and bone marrow [111] and lower systemic TNF- $\alpha$  levels [42]. In a model of maternal undernutrition induced by 50% caloric restriction in pregnant rats, single i.p. injection of LPS (500  $\mu$ g/kg) worsened anorexia and weight loss in adult offspring 36h later [112]. Moreover, LPS injection induced higher hypothalamic TNF- $\alpha$  levels in rats 6h later suggesting

hypothalamic inflammation [112]. Intravenous LPS increased plasmatic IL-6 levels in protein-energy malnourished rats weight [113].

LPS also alters gut morphology. Indeed, intraperitoneal injection of LPS at 5 to 30 mg/kg induced duodenal villus blunting [114][115]. Intraperitoneal LPS injection at 4mg/kg reduced jejunal trefoil peptides and goblet cells number in mice [116]. A single subcutaneous injection of LPS (1mg/kg) induced colonic hyperpermeability in rats 5h after LPS challenge [117]. This early dysfunction of gut barrier function may result from tight junction protein dysregulation. Indeed, *in vitro* LPS at 50µg/ml down-regulated occludin and ZO-1 expression and this effect was mediated by TLR-4 pathway [118–120]. LPS-induced gut barrier dysfunction was more severe in the ileum than in the colon 4 days later in rats [121]. LPS i.p injection (O55B7 10mg/kg) increased colonic histologic score and induced global intestinal hyperpermeability 12h later in mice [122]. In the latter study[122], LPS injection also decreased colonic ZO-1, occludin and claudin-1 protein expression.

Rodent models of endotoxemia have also been used to induce systemic inflammation. Accordingly, a single i.p injection of LPS (0.5 mg/kg – *E. coli* serotype O111 :B4) induced systemic inflammation 4h after injection with higher IFN- $\gamma$ , IL-6, MCP-1 and TNF- $\alpha$  levels [123]. Similarly, 10h post LPS i.p. injection (*Escherichia coli* O26:B6 - 1,5mg/kg), CD1 mice displayed increased cytokines levels (IL-1 $\beta$ , IL6, IL10, IL12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) [124]. In summary, although several studies using LPS injection have reported transient alterations of gut structure or function, the short duration of the effect and the variability of the response according to the dose and type of LPS make it difficult to use this model for the evaluation of therapeutic interventions targeting malnutrition and enteropathy.

#### **e. Indomethacin-induced enteropathy**

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most frequently used medications worldwide for routine relief of pain, fever, to manage various forms of arthritis or other inflammatory disorders and to prevent or treat cancers [125,126]. As a drawback to their

effectiveness, NSAIDs may damage the gastrointestinal (GI) tract and specifically the small intestine [127–129]. As an inhibitor of cyclooxygenase (COX), NSAID, and more especially cyclooxygenase-2 (Cox2) inhibitor, will impair prostaglandins production such as PGE<sub>2</sub> which is the most abundant in the small intestine and responsible for the regulation of mucus layer production [130]; accordingly, decreased PGE<sub>2</sub> production will result in decreased mucus layer thickness [130]. NSAID long term treatment will also impact microbiota composition with higher Gram negative bacteria abundance [127]. Clinical studies also indicated increased intestinal permeability in long-term NSAID-treated patients and intestinal inflammation reflected by increased fecal calprotectin concentration [131]. Decreased mucus layer and increased permeability will enhance mucosal exposure to luminal aggressive factors such as bile, enzymes and bacteria leading to exacerbated immune response [132]. Thus, NSAID-induced enteropathy, which is easily achieved with indomethacin in rodents, combines altered gut barrier function with intestinal inflammation (Figure 1). Subcutaneous injection of indomethacin (10mg/kg) in mice resulted in increased histopathological score in the small intestine at 12 and 24h [133,134]. Intra-gastric indomethacin administration at 10mg/kg increased histopathological score 48h later [135]. Indomethacin (10mg/kg) subcutaneous injection in mice increased intestinal permeability and induced ulcers 24h post administration [134]. These consequences have also been observed 24h after oral indomethacin administration [136,137] in mice (10mg/kg) and rats (15mg/kg). Gut permeability increased over the first hours after a single indomethacin gavage in rats (20mg/kg) and returned to normal 4 days post treatment [138]. Using a single administration may thus be inadequate for the pre-clinical evaluation of nutritional interventions over several days. Interestingly, a model of repeated gavages of indomethacin for 6 days (5mg/kg per day) has been developed in mice and elicited a prolonged gut hyperpermeability [139]. Underlying mechanisms probably involved tight junction protein alterations since lower claudin-1 and ZO-1 small intestine expression was observed 48h after intra-gastric administration of indomethacin (10mg/kg) in mice [140]. Indomethacin administration also led to epithelial barrier

architecture disruption with a lower villus/crypt ratio suggesting villus blunting, a marker of enteropathy [139].

In this model, gut inflammation is likely to result from the combination of mucosal injury and increased exposure to pathogens [132]. Indomethacin *per os* administration in rats (10mg/kg) increased jejunal and ileal TNF- $\alpha$  *ex vivo* production 24 to 48h after treatment [141]. Subcutaneous indomethacin injection (10mg/kg) induced higher small intestine mRNA levels of TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  and IL-6 12h [133] and 24h after injection [134]. Higher serum TNF- $\alpha$  cytokine level has been demonstrated in rats 12h after subcutaneous injection (7,5mg/kg) and lasted 4 days [142]. Single indomethacin gavage (10mg/kg) induced higher TNF- $\alpha$  and MCP-1 mRNA levels into small intestine in rats 24h later without TLR-4 protein expression modulation [143]. Indomethacin single gavage at 10mg/kg in TLR-4-mutant mice did not induce small intestinal damages or TNF- $\alpha$  and MCP-1 mRNA expression modulation, suggesting that enteropathy development is dependent of LPS/TLR-4/My-D88 pathway activation [143]. Moreover, indomethacin subcutaneous injection (10mg/kg) induced iNOS activity 24h later in rats [144]. Subcutaneous injection indomethacin (10mg/kg) triggered jejunal-ileal iNOS activity and neutrophils activation preceded by TNF- $\alpha$  production *ex vivo* suggesting NO role in intestinal injury induced by NSAID *via* TNF- $\alpha$  upregulation [141]. In a rat model of jejunoileitis, two indomethacin subcutaneous injections (7.5mg/kg - 24h apart) induced higher small intestinal MPO activity 4 days after the first injection [142]. Indomethacin single gavage (20mg/kg) increased fecal calprotectin, a marker of intestinal inflammation, from D5 to D7 after administration in rats [138]. Similarly, indomethacin gavage (5mg/kg once a day for 6 days) in mice resulted in increased fecal calprotectin concentration [139]. In summary, indomethacin induces enteropathy in preclinical models characterized by higher histopathological score, intestinal inflammation and hyperpermeability. As previously reported for LPS challenge, indomethacin effect on gut barrier is still transient and protocols with repeated administrations are required to evaluate therapeutic strategies.

## **Conclusion**

In the present review, we have reviewed and discussed the available animal models that may be useful to mimic the clinical features of SAM with EED. Although undernutrition induced by micro and/or macronutrients deficiencies can impair growth, it is not sufficient to induce enteropathy. Several combinations of infection and undernutrition can induce growth failure and affect gut barrier but these models seem to be specific of a pathogen and may lead to uncontrolled inflammatory response, which limit their validity. Development of non-infectious models of SAM with EED by associating undernutrition with triggers that induce growth failure with moderate and prolonged enteropathy appears to be the best approach so far to set up an easy and reproducible pre-clinical model allowing the evaluation of therapeutic strategies.

**Acknowledgments:** This study was supported by Nutriset SAS and the National Association of Research and Technology (ANRT) within the framework of a CIFRE convention, and the Charles Nicole Foundation.

**Author Contributions:** ES and RML wrote the manuscript; and all authors read, commented and approved the final manuscript

**Conflicts of Interest:** MZ and FM are employed by Nutriset S.A.S. Other authors have no conflict of interest to declare.

## References

1. Unicef, U.N.C.F.; (who), W.H.O.; wb], W.B. *Levels and Trends in Child Malnutrition*; eSocialSciences, 2018;
2. Black, R.E.; Victora, C.G.; Walker, S.P.; Bhutta, Z.A.; Christian, P.; de Onis, M.; Ezzati, M.; Grantham-McGregor, S.; Katz, J.; Martorell, R.; et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *The Lancet* **2013**, *382*, 427–451.
3. Victora, C.G.; Adair, L.; Fall, C.; Hallal, P.C.; Martorell, R.; Richter, L.; Sachdev, H.S.; Maternal and Child Undernutrition Study Group Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet* **2008**, *371*, 340–357.
4. Humphrey, J.H. Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing. *The Lancet* **2009**, *374*, 1032–1035.
5. Amadi, B.; Besa, E.; Zyambo, K.; Kaonga, P.; Louis-Auguste, J.; Chandwe, K.; Tarr, P.I.; Denno, D.M.; Nataro, J.P.; Faubion, W.; et al. Impaired Barrier Function and Autoantibody Generation in Malnutrition Enteropathy in Zambia. *EBioMedicine* **2017**, *22*, 191–199.
6. Farràs, M.; Chandwe, K.; Mayneris-Perxachs, J.; Amadi, B.; Louis-Auguste, J.; Besa, E.; Zyambo, K.; Guerrant, R.; Kelly, P.; Swann, J.R. Characterizing the metabolic phenotype of intestinal villus blunting in Zambian children with severe acute malnutrition and persistent diarrhea. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192092.
7. Attia, S.; Versloot, C.J.; Voskuil, W.; van Vliet, S.J.; Di Giovanni, V.; Zhang, L.; Richardson, S.; Bourdon, C.; Netea, M.G.; Berkley, J.A.; et al. Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *104*, 1441–1449.
8. Kosek, M.; Guerrant, R.L.; Kang, G.; Bhutta, Z.; Yori, P.P.; Gratz, J.; Gottlieb, M.; Lang, D.; Lee, G.; Haque, R.; et al. Assessment of environmental enteropathy in the MAL-ED cohort study: theoretical and analytic framework. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59 Suppl 4*, S239-247.
9. Ibrahim, M.K.; Zambruni, M.; Melby, C.L. crossm Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. **2017**, *30*, 919–971.
10. Núñez, I.N.; Galdeano, C.M.; Carmuega, E.; Weill, R.; de Moreno de LeBlanc, A.; Perdigón, G. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein-energy malnutrition. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 500–508.

11. Pan, F.; Zhang, L.; Li, M.; Hu, Y.; Zeng, B.; Yuan, H.; Zhao, L.; Zhang, C. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammaging effects in calorie-restricted mice. *Microbiome* **2018**, *6*.
12. Park, C.Y.; Park, S.; Kim, M.S.; Kim, H.-K.; Han, S.N. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *490*, 636–642.
13. Ma, T.Y.; Hollander, D.; Dadufalza, V.; Krugliak, P. Effect of aging and caloric restriction on intestinal permeability. *Exp Gerontol* **1992**, *27*, 321–333.
14. Mehus, A.A.; Picklo, M.J. Brain and Hepatic Mt mRNA Is Reduced in Response to Mild Energy Restriction and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency in Juvenile Rats. *Nutrients* **2017**, *9*.
15. Jahng, J.W.; Kim, J.G.; Kim, H.J.; Kim, B.-T.; Kang, D.-W.; Lee, J.-H. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Res.* **2007**, *1150*, 100–107.
16. Islam, M.A.; Rahman, M.M.; Mahalanabis, D. Maternal and socioeconomic factors and the risk of severe malnutrition in a child: a case-control study. *Eur J Clin Nutr* **1994**, *48*, 416–424.
17. Hallam, M.C.; Reimer, R.A. Postnatal Prebiotic Fiber Intake in Offspring Exposed to Gestational Protein Restriction Has Sex-Specific Effects on Insulin Resistance and Intestinal Permeability in Rats. *Journal of Nutrition* **2014**, *144*, 1556–1563.
18. Aubert, P.; Oleynikova, E.; Rizvi, H.; Ndjim, M.; Le Berre-Scoul, C.; Grohard, P.A.; Chevalier, J.; Segain, J.-P.; Le Drean, G.; Neunlist, M.; et al. Maternal protein restriction induces gastrointestinal dysfunction and enteric nervous system remodeling in rat offspring. *FASEB J.* **2019**, *33*, 770–781.
19. Pinheiro, D.F.; Pacheco, P.D.G.; Alvarenga, P.V.; Buratini, J.; Castilho, A.C.S.; Lima, P.F.; Sartori, D.R.S.; Vicentini-Paulino, M.L.M. Maternal protein restriction affects gene expression and enzyme activity of intestinal disaccharidases in adult rat offspring. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2013**, *46*, 287–292.
20. Chen, Y.; Mou, D.; Hu, L.; Zhen, J.; Che, L.; Fang, Z.; Xu, S.; Lin, Y.; Feng, B.; Li, J.; et al. Effects of Maternal Low-Energy Diet during Gestation on Intestinal Morphology, Disaccharidase Activity, and Immune Response to Lipopolysaccharide Challenge in Pig Offspring. *Nutrients* **2017**, *9*.
21. D’Inca, R.; Kloareg, M.; Gras-Le Guen, C.; Le Huërou-Luron, I. Intrauterine growth restriction modifies the developmental pattern of intestinal structure, transcriptomic profile, and bacterial colonization in neonatal pigs. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 925–931.



22. Ferenc, K.; Pilżys, T.; Skrzypek, T.; Garbicz, D.; Marcinkowski, M.; Dylewska, M.; Gładysz, P.; Skorobogatov, O.; Gajewski, Z.; Grzesiuk, E.; et al. Structure and Function of Enterocyte in Intrauterine Growth Retarded Pig Neonates. *Dis. Markers* **2017**, *2017*, 5238134.
23. He, Z.X.; Sun, Z.H.; Yang, W.Z.; Beauchemin, K.A.; Tang, S.X.; Zhou, C.S.; Han, X.F.; Wang, M.; Kang, J.H.; Tan, Z.L. Effects of maternal protein or energy restriction during late gestation on immune status and responses to lipopolysaccharide challenge in postnatal young goats. *J. Anim. Sci.* **2014**, *92*, 4856–4864.
24. Batista, T.H.; Veronesi, V.B.; Ribeiro, A.C.A.F.; Giusti-Paiva, A.; Vilela, F.C. Protein malnutrition during pregnancy alters maternal behavior and anxiety-like behavior in offspring. *Nutr Neurosci* **2017**, *20*, 437–442.
25. Crossland, R.F.; Balasa, A.; Ramakrishnan, R.; Mahadevan, S.K.; Fiorotto, M.L.; Van den Veyver, I.B. Chronic Maternal Low-Protein Diet in Mice Affects Anxiety, Night-Time Energy Expenditure and Sleep Patterns, but Not Circadian Rhythm in Male Offspring. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170127.
26. Gressens, P.; Muaku, S.M.; Besse, L.; Nsegbe, E.; Gallego, J.; Delpech, B.; Gaultier, C.; Evrard, P.; Ketelslegers, J.M.; Maiter, D. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **1997**, *103*, 21–35.
27. Alamy, M.; Bengelloun, W.A. Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. *Neurosci Biobehav Rev* **2012**, *36*, 1463–1480.
28. Marwarha, G.; Claycombe-Larson, K.; Schommer, J.; Ghribi, O. Maternal low-protein diet decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the brains of the neonatal rat offspring. *J. Nutr. Biochem.* **2017**, *45*, 54–66.
29. Reyes-Castro, L.A.; Padilla-Gómez, E.; Parga-Martínez, N.J.; Castro-Rodríguez, D.C.; Quirarte, G.L.; Díaz-Cintra, S.; Nathanielsz, P.W.; Zambrano, E. Hippocampal mechanisms in impaired spatial learning and memory in male offspring of rats fed a low-protein isocaloric diet in pregnancy and/or lactation. *Hippocampus* **2018**, *28*, 18–30.
30. Gould, J.M.; Smith, P.J.; Airey, C.J.; Mort, E.J.; Airey, L.E.; Warricker, F.D.M.; Pearson-Farr, J.E.; Weston, E.C.; Gould, P.J.W.; Semmence, O.G.; et al. Mouse maternal protein restriction during preimplantation alone permanently alters brain neuron proportion and adult short-term memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, E7398–E7407.
31. Laeger, T.; Reed, S.D.; Henagan, T.M.; Fernandez, D.H.; Taghavi, M.; Addington, A.;

Münzberg, H.; Martin, R.J.; Hutson, S.M.; Morrison, C.D. Leucine acts in the brain to suppress food intake but does not function as a physiological signal of low dietary protein. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2014**, *307*, R310-320.

32. Hill, C.M.; Laeger, T.; Albarado, D.C.; McDougal, D.H.; Berthoud, H.-R.; Münzberg, H.; Morrison, C.D. Low protein-induced increases in FGF21 drive UCP1-dependent metabolic but not thermoregulatory endpoints. *Sci Rep* **2017**, *7*.

33. Pezeshki, A.; Zapata, R.C.; Singh, A.; Yee, N.J.; Chelikani, P.K. Low protein diets produce divergent effects on energy balance. *Sci Rep* **2016**, *6*, 25145.

34. Brown, E.M.; Wlodarska, M.; Willing, B.P.; Vonaesch, P.; Han, J.; Reynolds, L.A.; Arrieta, M.-C.; Uhrig, M.; Scholz, R.; Partida, O.; et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. *Nature Communications* **2015**, *6*, 7806.

35. Eyzaguirre-Velasquez, J.; Olavarria-Ramirez, L.; Gonzalez-Arancibia, C.; Diaz-Merino, C.; Ariz, R.; Lopez, S.; Quiroz, W.; Beltran, C.J.; Bravo, J.A.; Julio-Pieper, M. Protein Malnutrition During Juvenile Age Increases Ileal and Colonic Permeability in the Rat. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **2016**, *00*, 1–7.

36. Belmonte, L.; Coëffier, M.; Le Pessot, F.; Miralles-Barrachina, O.; Hiron, M.; Leplingard, A.; Lemeland, J.-F.; Hecketsweiler, B.; Daveau, M.; Ducrotté, P.; et al. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. *World J Gastroenterol* **2007**, *13*, 2833–2840.

37. Mayneris-Perxachs, J.; Bolick, D.T.; Leng, J.; Medlock, G.L.; Kolling, G.L.; Papin, J.A.; Swann, J.R.; Guerrant, R.L. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *104*, 1253–1262.

38. Dalvi, P.S.; Yang, S.; Swain, N.; Kim, J.; Saha, S.; Bourdon, C.; Zhang, L.; Chami, R.; Bandsma, R.H.J. Long-term metabolic effects of malnutrition: Liver steatosis and insulin resistance following early-life protein restriction. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0199916.

39. Corware, K.; Yardley, V.; Mack, C.; Schuster, S.; Al-Hassi, H.; Herath, S.; Bergin, P.; Modolell, M.; Munder, M.; Müller, I.; et al. Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages. *Nutr Metab (Lond)* **2014**, *11*, 51.

40. Miyazaki, A.; Kandasamy, S.; Michael, H.; Langel, S.N.; Paim, F.C.; Chepngeno, J.; Alhamo, M.A.; Fischer, D.D.; Huang, H.-C.; Srivastava, V.; et al. Protein deficiency reduces efficacy of oral attenuated human rotavirus vaccine in a human infant fecal microbiota transplanted gnotobiotic pig

model. *Vaccine* **2018**, *36*, 6270–6281.

41. Rho, S.; Kim, H.; Shim, S.H.; Lee, S.Y.; Kim, M.J.; Yang, B.-G.; Jang, M.H.; Han, B.W.; Song, M.K.; Czerkinsky, C.; et al. Protein energy malnutrition alters mucosal IgA responses and reduces mucosal vaccine efficacy in mice. *Immunol. Lett.* **2017**, *190*, 247–256.

42. Santos, A.C.A.; Correia, C.A.; de Oliveira, D.C.; Nogueira-Pedro, A.; Borelli, P.; Fock, R.A. Intravenous Glutamine Administration Modulates TNF- $\alpha$ /IL-10 Ratio and Attenuates NF $\kappa$ B Phosphorylation in a Protein Malnutrition Model. *Inflammation* **2016**, *39*, 1883–1891.

43. Fock, R.A.; Vinolo, M.A.R.; Crisma, A.R.; Nakajima, K.; Rogero, M.M.; Borelli, P. Protein-energy malnutrition modifies the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2008**, *54*, 371–377.

44. Fock, R.A.; Rogero, M.M.; Aurélio, M.; Vinolo, R.; Curi, R.; Borges, M.C.; Borelli, P. Effects of Protein-Energy Malnutrition on NF-KappaB Signalling in Murine Peritoneal Macrophages. *Inflammation* **2010**, *33*.

45. Bhutta, Z.A.; Berkley, J.A.; Bandsma, R.H.J.; Kerac, M.; Trehan, I.; Briend, A. Severe childhood malnutrition. *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3*, 17067.

46. Teodósio, N.R.; Lago, E.S.; Romani, S.A.M.; Guedes, R.C.A. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* **1990**, *XL*, 533–547.

47. Brigide, P.; Ataíde, T.R.; Baptista, A.S.; Canniatti-Brazaca, S.G.; Abdalla, A.L.; Nascimento Filho, V.F.; Piedade, S.M.S.; Sant’ana, A.E.G. Bioavailability of iron in the regional basic diet (RBD) with dietary supplement in Brazil. *Biol Trace Elem Res* **2011**, *140*, 53–65.

48. Ueno, P.M.; Oriá, R.B.; Maier, E.A.; Guedes, M.; Azevedo, O.G.D.; Wu, D.; Willson, T.; Hogan, S.P.; Lima, A.A.M.; Guerrant, R.L.; et al. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2011**, 612–622.

49. Sampaio, I.C.; Medeiros, P.H.Q.S.; Rodrigues, F. a. P.; Cavalcante, P.A.; Ribeiro, S.A.; Oliveira, J.S.; Prata, M.M.G.; Costa, D.V.S.; Fonseca, S.G.C.; Guedes, M.M.; et al. Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2016**, *49*, e5340.

50. de Queiroz, C.A.; Fonseca, S.G.C.; Frota, P.B.; Figueiredo, I.L.; Aragão, K.S.; Magalhães, C.E.C.; de Carvalho, C.B.; Lima, A.Â.M.; Ribeiro, R. a; Guerrant, R.L.; et al. Zinc treatment ameliorates

diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. *BMC gastroenterology* **2014**, *14*, 136.

51. Bartelt, L.A.; Bolick, D.T.; Kolling, G.L.; Roche, J.K.; Zaenker, E.I.; Lara, A.M.; Noronha, F.J.; Cowardin, C.A.; Moore, J.H.; Turner, J.R.; et al. Cryptosporidium Priming Is More Effective than Vaccine for Protection against Cryptosporidiosis in a Murine Protein Malnutrition Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2016**, *10*, 1–29.

52. Williams, C.D. A nutritional disease of childhood associated with a maize diet. *Arch Dis Child* **1933**, *8*, 423–433.

53. May, T.; Klatt, K.C.; Smith, J.; Castro, E.; Manary, M.; Caudill, M.A.; Jahoor, F.; Fiorotto, M.L. Choline Supplementation Prevents a Hallmark Disturbance of Kwashiorkor in Weanling Mice Fed a Maize Vegetable Diet: Hepatic Steatosis of Undernutrition. *Nutrients* **2018**, *10*.

54. Furuta, C.; Murakami, H. A Novel Concept of Amino Acid Supplementation to Improve the Growth of Young Malnourished Male Rats. *Ann. Nutr. Metab.* **2018**, *72*, 231–240.

55. Follis, R.H. A kwashiorkor-like syndrome observed in monkeys fed maize. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1957**, *96*, 523–528.

56. Lykke, M.; Hother, A.-L.; Hansen, C.F.; Friis, H.; Mølgaard, C.; Michaelsen, K.F.; Briend, A.; Larsen, T.; Sangild, P.T.; Thymann, T. Malnutrition induces gut atrophy and increases hepatic fat infiltration: studies in a pig model of childhood malnutrition. *Am J Transl Res* **2013**, *5*, 543–554.

57. Charbonneau, M.R.; O'Donnell, D.; Blanton, L.V.; Totten, S.M.; Davis, J.C.C.; Barratt, M.J.; Cheng, J.; Guruge, J.; Talcott, M.; Bain, J.R.; et al. Sialylated Milk Oligosaccharides Promote Microbiota-Dependent Growth in Models of Infant Undernutrition. *Cell* **2016**, *164*, 859–871.

58. Krebs, N.F.; Miller, L.V.; Hambidge, K.M. Zinc deficiency in infants and children: a review of its complex and synergistic interactions. *Paediatrics and International Child Health* **2014**, *34*, 279–288.

59. Koo, S.I.; Turk, D.E. Effect of zinc deficiency on the ultrastructure of the pancreatic acinar cell and intestinal epithelium in the rat. *J. Nutr.* **1977**, *107*, 896–908.

60. Wapnir, R.A.; Garcia-Aranda, J.A.; Mevorach, D.E.; Lifshitz, F. Differential absorption of zinc and low-molecular-weight ligands in the rat gut in protein-energy malnutrition. *J. Nutr.* **1985**, *115*, 900–908.

61. Van Wouwe, J.P.; Veldhuizen, M. Growth characteristics in laboratory animals fed zinc-deficient, copper-deficient, of histidine-supplemented diets. *Biol Trace Elem Res* **1996**, *55*, 71–77.

62. Bolick, D.T.; Kolling, G.L.; Moore, J.H.; de Oliveira, L.A.; Tung, K.; Philipson, C.; Viladomiu, M.;

Hontecillas, R.; Bassaganya-Riera, J.; Guerrant, R.L. Zinc deficiency alters host response and pathogen virulence in a mouse model of enteroaggregative *Escherichia coli*-induced diarrhea. *Gut Microbes* **2014**, *5*, 618–627.

63. Zhong, W.; Zhao, Y.; Sun, X.; Song, Z.; McClain, C.J.; Zhou, Z. Dietary zinc deficiency exaggerates ethanol-induced liver injury in mice: involvement of intrahepatic and extrahepatic factors. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76522.

64. Q S Medeiros, P.H.; Ledwaba, S.E.; Bolick, D.T.; Giallourou, N.; Yum, L.K.; Costa, D.V.S.; Oriá, R.B.; Barry, E.M.; Swann, J.R.; Lima, A.Â.M.; et al. A murine model of diarrhea, growth impairment and metabolic disturbances with *Shigella flexneri* infection and the role of zinc deficiency. *Gut Microbes* **2019**, 1–16.

65. Scott, M.E.; Koski, K.G. Zinc deficiency impairs immune responses against parasitic nematode infections at intestinal and systemic sites. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1412S–20S.

66. De Filippo, C.; Cavalieri, D.; Di Paola, M.; Ramazzotti, M.; Poullet, J.B.; Massart, S.; Collini, S.; Pieraccini, G.; Lionetti, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 14691–14696.

67. Subramanian, S.; Huq, S.; Yatsunenko, T.; Haque, R.; Mahfuz, M.; Alam, M.A.; Benezra, A.; DeStefano, J.; Meier, M.F.; Muegge, B.D.; et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature* **2014**, *510*, 417–421.

68. Vonaesch, P.; Morien, E.; Andrianonimiadana, L.; Sanke, H.; Mbecko, J.-R.; Huus, K.E.; Naharimanananirina, T.; Gondje, B.P.; Nigatoloum, S.N.; Vondo, S.S.; et al. Stunted childhood growth is associated with decompartmentalization of the gastrointestinal tract and overgrowth of oropharyngeal taxa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115*, E8489–E8498.

69. Bartelt, L.A.; Bolick, D.T.; Mayneris-Perxachs, J.; Kolling, G.L.; Medlock, G.L.; Zaenker, E.I.; Donowitz, J.; Thomas-Beckett, R.V.; Rogala, A.; Carroll, I.M.; et al. Cross-modulation of pathogen-specific pathways enhances malnutrition during enteric co-infection with *Giardia lamblia* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006471.

70. Kau, A.L.; Planer, J.D.; Liu, J.; Rao, S.; Yatsunenko, T.; Trehan, I.; Manary, M.J.; Liu, T.-C.; Stappenbeck, T.S.; Maleta, K.M.; et al. Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Sci Transl Med* **2015**, *7*, 276ra24.

71. Smith, M.I.; Yatsunenko, T.; Manary, M.J.; Trehan, I.; Mkakosya, R.; Cheng, J.; Kau, A.L.; Rich,

S.S.; Concannon, P.; Mychaleckyj, J.C.; et al. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science* **2013**, *339*, 548–554.

72. Brown, E.M.; Arrieta, M.-C.; Finlay, B.B. A fresh look at the hygiene hypothesis: How intestinal microbial exposure drives immune effector responses in atopic disease. *Seminars in Immunology* **2013**, *25*, 378–387.

73. Kau, A.L.; Ahern, P.P.; Griffin, N.W.; Goodman, A.L.; Gordon, J.I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* **2011**, *474*, 327–336.

74. Tzipori, S.; Ward, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 1047–1058.

75. Dillingham, R.A.; Lima, A.A.; Guerrant, R.L. Cryptosporidiosis: Epidemiology and impact. *Microbes and Infection* **2002**, *4*, 1059–1066.

76. Huang, D.B.; Chappell, C.; Okhuysen, P.C. Cryptosporidiosis in children. *Semin Pediatr Infect Dis* **2004**, *15*, 253–259.

77. Tanriverdi, S.; Grinberg, A.; Chalmers, R.M.; Hunter, P.R.; Petrovic, Z.; Akiyoshi, D.E.; London, E.; Zhang, L.; Tzipori, S.; Tumwine, J.K.; et al. Inferences about the global population structures of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 7227–7234.

78. Agnew, D.G.; Lima, A.A.; Newman, R.D.; Wuhib, T.; Moore, R.D.; Guerrant, R.L.; Sears, C.L. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increased diarrhea morbidity. *J. Infect. Dis.* **1998**, *177*, 754–760.

79. Guerrant, D.I.; Moore, S.R.; Lima, A.A.; Patrick, P.D.; Schorling, J.B.; Guerrant, R.L. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *61*, 707–713.

80. Gendrel, D.; Treluyer, J.M.; Richard-Lenoble, D. Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. *Fundam Clin Pharmacol* **2003**, *17*, 189–197.

81. Katona, P.; Katona-Apte, J. The interaction between nutrition and infection. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, 1582–1588.

82. Coutinho, B.P.; Oriá, R.B.; Vieira, C.M.G.; Sevilleja, J.E. a D.; Warren, C. a; Maciel, J.G.; Thompson, M.R.; Pinkerton, R.C.; Aldo, a M.; Guerrant, R.L. *Cryptosporidium* Infection Causes

Undernutrition and Conversely, Weanling Undernutrition Intensifies Infection. *J Parasitol.* **2008**, *94*, 1225–1232.

83. Costa, L.B.; JohnBull, E.A.; Reeves, J.T.; Sevilleja, J.E.; Freire, R.S.; Hoffman, P.S.; Lima, A.A.M.; Oriá, R.B.; Roche, J.K.; Guerrant, R.L.; et al. Cryptosporidium-malnutrition interactions: mucosal disruption, cytokines, and TLR signaling in a weaned murine model. *J. Parasitol.* **2011**, *97*, 1113–1120.

84. Bolick, D.T.; Mayneris-Perxachs, J.; Medlock, G.L.; Kolling, G.L.; Papin, J.A.; Swann, J.R.; Guerrant, R.L. Increased Urinary Trimethylamine N-Oxide Following Cryptosporidium Infection and Protein Malnutrition Independent of Microbiome Effects. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, 64–71.

85. Tinuade, O.; John, O.; Saheed, O.; Oyeku, O.; Fidelis, N.; Olabisi, D. Parasitic etiology of childhood diarrhea. *Indian J Pediatr* **2006**, *73*, 1081–1084.

86. Einarsson, E.; Ma'ayeh, S.; Svärd, S.G. An up-date on Giardia and giardiasis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *34*, 47–52.

87. Squire, S.A.; Ryan, U. Cryptosporidium and Giardia in Africa: current and future challenges. *Parasit Vectors* **2017**, *10*, 195.

88. Caron, Y.; Hong, R.; Gauthier, L.; Lailou, A.; Wieringa, F.T.; Berger, J.; Poirot, E. Stunting, Beyond Acute Diarrhoea: Giardia Duodenalis, in Cambodia. *Nutrients* **2018**, *10*.

89. Denno, D.M.; VanBuskirk, K.; Nelson, Z.C.; Musser, C.A.; Hay Burgess, D.C.; Tarr, P.I. Use of the lactulose to mannitol ratio to evaluate childhood environmental enteric dysfunction: a systematic review. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59 Suppl 4*, S213-219.

90. Hjelt, K.; Paerregaard, A.; Krasilnikoff, P.A. Giardiasis causing chronic diarrhoea in suburban Copenhagen: incidence, physical growth, clinical symptoms and small intestinal abnormality. *Acta Paediatr.* **1992**, *81*, 881–886.

91. Goto, R.; Panter-Brick, C.; Northrop-Clewes, C.A.; Manahdhar, R.; Tuladhar, N.R. Poor intestinal permeability in mildly stunted Nepali children: associations with weaning practices and Giardia lamblia infection. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, 141–149.

92. Upadhyay, P.; Ganguly, N.K.; Mahajan, R.C.; Walia, B.N. Intestinal uptake of nutrients in normal and malnourished animals infected with Giardia lamblia. *Digestion* **1985**, *32*, 243–248.

93. Buret, A.; Gall, D.G.; Olson, M.E. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *J. Parasitol.* **1990**, *76*, 403–409.

94. Astiazarán-García, H.; Espinosa-Cantellano, M.; Castañón, G.; Chávez-Munguía, B.; Martínez-

Palomo, A. Giardia lamblia: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol.* **2000**, *95*, 128–135.

95. Shukla, G.; Bhatia, R.; Sharma, A. Prebiotic inulin supplementation modulates the immune response and restores gut morphology in *Giardia duodenalis*-infected malnourished mice. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 4189–4198.

96. Shukla, G.; Sidhu, R.K. Lactobacillus casei as a probiotic in malnourished *Giardia lamblia*-infected mice: a biochemical and histopathological study. *Can. J. Microbiol.* **2011**, *57*, 127–135.

97. Bartelt, L.A.; Roche, J.; Kolling, G.; Bolick, D.; Noronha, F.; Naylor, C.; Hoffman, P.; Warren, C.; Singer, S.; Guerrant, R. Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *J Clin Invest* **2013**, *123*, 2672–2684.

98. Platts-Mills, J.A.; Babji, S.; Bodhidatta, L.; Gratz, J.; Haque, R.; Havt, A.; McCormick, B.J.; McGrath, M.; Olortegui, M.P.; Samie, A.; et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *The Lancet Global Health* **2015**, *3*, e564–e575.

99. Muhsen, K.; Levine, M.M. A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55* Suppl 4, S271-293.

100. Kosek, M.N.; MAL-ED Network Investigators Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. *EBioMedicine* **2017**, *18*, 109–117.

101. Rogawski, E.T.; Liu, J.; Platts-Mills, J.A.; Kabir, F.; Lertsethtakarn, P.; Sigvas, M.; Khan, S.S.; Prahara, I.; Murei, A.; Nshama, R.; et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. *The Lancet Global Health* **2018**, *6*, e1319–e1328.

102. Diarrhoeal disease Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease> (accessed on Apr 20, 2019).

103. Grenov, B.; Briend, A.; Sangild, P.T.; Thymann, T.; Rytter, M.H.; Hother, A.-L.; Mølgaard, C.; Michaelsen, K.F. Undernourished Children and Milk Lactose. *Food Nutr Bull* **2016**, *37*, 85–99.

104. Mitra, S.K.; Sachan, A.; Udupa, V.; Seshadri, S.J.; Jayakumar, K. Histological changes in intestine in semichronic diarrhoea induced by lactose enriched diet in rats: effect of Diarex-Vet.



*Indian J. Exp. Biol.* **2003**, *41*, 211–215.

105. Galvez, J.; Zarzuelo, A.; Crespo, M.E.; Lorente, M.D.; Ocete, M.A.; Jiménez, J. Antidiarrhoeic Activity of *Euphorbia hirta* Extract and Isolation of an Active Flavonoid Constituent. *Planta Med* **1993**, *59*, 333–336.

106. de Queiroz, C.A.; Fonseca, S.G.C.; Frota, P.B.; Figueiredo, I.L.; Aragão, K.S.; Magalhães, C.E.C.; de Carvalho, C.B.; Lima, A.Â.M.; Ribeiro, R. a; Guerrant, R.L.; et al. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. *BMC gastroenterology* **2014**, *14*, 136.

107. Leforestier, G.; Blais, A.; Blachier, F.; Marsset-Baglieri, A.; Davila-Gay, A.-M.; Perrin, E.; Tomé, D. Effects of galacto-oligosaccharide ingestion on the mucosa-associated mucins and sucrase activity in the small intestine of mice. *Eur J Nutr* **2009**, *48*, 457–464.

108. Whitfield, C.; Trent, M.S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 99–128.

109. Park, B.S.; Lee, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* **2013**, *45*, e66.

110. Bandsma, R.H.J.; Ackerley, C.; Koulajian, K.; Zhang, L.; Zutphen, T.V.; Dijk, T.H.V.; Xiao, C.; Giacca, A.; Lewis, G.F. A low-protein diet combined with low-dose endotoxin leads to changes in glucose homeostasis in weanling rats. **2015**, 466–473.

111. Fock, R.A.; Vinolo, M.A.R.; Blatt, S.L.; Borelli, P. Impairment of the hematological response and interleukin-1?? production in protein-energy malnourished mice after endotoxemia with lipopolysaccharide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2012**, *45*, 1163–1171.

112. Iwasa, T.; Matsuzaki, T.; Tungalagsuvd, A.; Munkhzaya, M.; Kuwahara, A.; Yasui, T.; Irahara, M. Prenatal undernutrition increases the febrile response to lipopolysaccharides in adulthood in male rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* **2015**, *44*, 1–5.

113. Lyoumi, S.; Tamion, F.; Petit, J.; Dechelotte, P.; Daugey, C.; Scotte, M.; Hiron, M.; Leplingard, A.; Salier, J.P.; Daveau, M.; et al. Induction and modulation of acute-phase response by protein malnutrition in rats: comparative effect of systemic and localized inflammation on interleukin-6 and acute-phase protein synthesis. *J.Nutr.* **1998**, *128*, 166–174.

114. Cui, Y.; Wang, Q.; Wang, M.; Jia, J.; Wu, R. Gardenia Decoction Prevent Intestinal Mucosal Injury by Inhibiting Pro-inflammatory Cytokines and NF-κB Signaling. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, 180.

115. Yang, X.-J.; Qian, J.-X.; Wei, Y.; Guo, Q.; Jin, J.; Sun, X.; Liu, S.-L.; Xu, C.-F.; Zhang, G.-X.

Tanshinone IIA Sodium Sulfonate Attenuates LPS-Induced Intestinal Injury in Mice. *Gastroenterol Res Pract* **2018**, 2018, 9867150.

116. Han, J.; Xu, Y.; Yang, D.; Yu, N.; Bai, Z.; Bian, L. Effect of Polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* on Intestinal Mucosal Barrier of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide Challenged Mice. **2016**, 29, 134–141.

117. Nozu, T.; Miyagishi, S.; Kumei, S.; Nozu, R.; Takakusaki, K.; Okumura, T. Lovastatin inhibits visceral allodynia and increased colonic permeability induced by lipopolysaccharide or repeated water avoidance stress in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, 818, 228–234.

118. Bein, A.; Zilbershtein, A.; Golosovsky, M.; Davidov, D.; Schwartz, B. LPS Induces Hyper-Permeability of Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Cellular Physiology* **2017**, 232, 381–390.

119. Guo, S.; Al-sadi, R.; Said, H.M.; Ma, T.Y. Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of. *The American Journal of Pathology* **2013**, 182, 375–387.

120. Guo, S.; Nighot, M.; Al-Sadi, R.; Alhmoud, T.; Nighot, P.; Ma, T.Y. Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. *The Journal of Immunology* **2015**, 195, 4999–5010.

121. Yue, C.; Wang, W.; Tian, W.-L.; Huang, Q.; Zhao, R.-S.; Zhao, Y.-Z.; Li, Q.-R.; Li, J.-S. Lipopolysaccharide-induced failure of the gut barrier is site-specific and inhibitable by growth hormone. *Inflamm. Res.* **2013**, 62, 407–415.

122. Chen, S.; Bu, D.; Ma, Y.; Zhu, J.; Sun, L.; Zuo, S.; Ma, J.; Li, T.; Chen, Z.; Zheng, Y.; et al. GYY4137 ameliorates intestinal barrier injury in a mouse model of endotoxemia. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, 118, 59–67.

123. Holloway, P.M.; Gillespie, S.; Becker, F.; Vital, S.A.; Nguyen, V.; Alexander, J.S.; Evans, P.C.; Gavins, F.N.E. Sulforaphane induces neurovascular protection against a systemic inflammatory challenge via both Nrf2-dependent and independent pathways. *Vascul. Pharmacol.* **2016**, 85, 29–38.

124. Cai, K.C.; van Mil, S.; Murray, E.; Mallet, J.-F.; Matar, C.; Ismail, N. Age and sex differences in immune response following LPS treatment in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* **2016**, 58, 327–337.

125. Thun, M.J.; Henley, S.J.; Patrono, C. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues. *J Natl Cancer Inst* **2002**, 94, 252–266.

126. Nash, D.B. The Use of Medicines in the United States: A Detailed Review. *Am Health Drug Benefits* **2012**, *5*, 423.
127. Syer, S.D.; Wallace, J.L. Environmental and NSAID-enteropathy: dysbiosis as a common factor. *Curr Gastroenterol Rep* **2014**, *16*, 377.
128. Graham, D.Y.; Opekun, A.R.; Willingham, F.F.; Qureshi, W.A. Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID users. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2005**, *3*, 55–59.
129. Sugimori, S.; Watanabe, T.; Tabuchi, M.; Kameda, N.; Machida, H.; Okazaki, H.; Tanigawa, T.; Yamagami, H.; Shiba, M.; Watanabe, K.; et al. Evaluation of small bowel injury in patients with rheumatoid arthritis by capsule endoscopy: effects of anti-rheumatoid arthritis drugs. *Digestion* **2008**, *78*, 208–213.
130. Tanaka, A.; Hase, S.; Miyazawa, T.; Ohno, R.; Takeuchi, K. Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 1248–1254.
131. Fortun, P.J.; Hawkey, C.J. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the small intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2005**, *21*, 169–175.
132. Bjarnason, I.; Hayllar, J.; MacPherson, A.J.; Russell, A.S. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* **1993**, *104*, 1832–1847.
133. Horibe, S.; Tanahashi, T.; Kawauchi, S.; Mizuno, S.; Rikitake, Y. Preventative effects of sodium alginate on indomethacin-induced small-intestinal injury in mice. *International Journal of Medical Sciences* **2016**, *13*, 653–663.
134. Yoshikawa, K.; Kurihara, C.; Furuhashi, H.; Takajo, T.; Maruta, K.; Yasutake, Y.; Sato, H.; Narimatsu, K.; Okada, Y.; Higashiyama, M.; et al. Psychological stress exacerbates NSAID-induced small bowel injury by inducing changes in intestinal microbiota and permeability via glucocorticoid receptor signaling. *Journal of Gastroenterology* **2017**, *52*, 61–71.
135. Han, Y.-M.; Park, J.-M.; Kang, J.X.; Cha, J.-Y.; Lee, H.-J.; Jeong, M.; Go, E.-J.; Hahm, K.B. Mitigation of indomethacin-induced gastrointestinal damages in fat-1 transgenic mice via gate-keeper action of  $\omega$ -3-polyunsaturated fatty acids. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 33992.
136. Nagai, K.; Ueno, Y.; Tanaka, S.; Hayashi, R.; Shinagawa, K.; Chayama, K. Polysaccharides derived from *Ganoderma lucidum* fungus mycelia ameliorate indomethacin-induced small intestinal injury via induction of GM-CSF from macrophages. *Cell. Immunol.* **2017**, *320*, 20–28.

137. Kwak, D.S.; Lee, O.Y.; Lee, K.N.; Jun, D.W.; Lee, H.L.; Yoon, B.C.; Choi, H.S. The Effect of DA-6034 on Intestinal Permeability in an Indomethacin- Induced Small Intestinal Injury Model. **2016**, *10*, 406–411.
138. Jacob, M.; Foster, R.; Sigthorsson, G.; Simpson, R.; Bjarnason, I. Role of bile in pathogenesis of indomethacin-induced enteropathy. *Archives of Toxicology* **2007**, *81*, 291–298.
139. Whitfield-Cargile, C.M.; Cohen, N.D.; Chapkin, R.S.; Weeks, B.R.; Davidson, L.A.; Goldsby, J.S.; Hunt, C.L.; Steinmeyer, S.H.; Menon, R.; Suchodolski, J.S.; et al. The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes* **2016**, *7*, 246–261.
140. Han, Y.-M.; Park, J.-M.; Kang, J.X.; Cha, J.-Y.; Lee, H.-J.; Jeong, M.; Go, E.-J.; Hahm, K.B. Mitigation of indomethacin-induced gastrointestinal damages in fat-1 transgenic mice via gate-keeper action of  $\omega$ -3-polyunsaturated fatty acids. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 33992.
141. Bertrand, V.; Guimbaud, R.; Tulliez, M.; Mauprivez, C.; Sogni, P.; Couturier, D.; Giroud, J.P.; Chaussade, S.; Chauvelot-Moachon, L. Increase in tumor necrosis factor-alpha production linked to the toxicity of indomethacin for the rat small intestine. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *124*, 1385–1394.
142. Saud, B.; Nandi, J.; Ong, G.; Finocchiaro, S.; Levine, R.A. Inhibition of TNF-alpha improves indomethacin-induced enteropathy in rats by modulating iNOS expression. *Dig. Dis. Sci.* **2005**, *50*, 1677–1683.
143. Watanabe, T.; Higuchi, K.; Kobata, A.; Nishio, H.; Tanigawa, T.; Shiba, M.; Tominaga, K.; Fujiwara, Y.; Oshitani, N.; Asahara, T.; et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut* **2008**, *57*, 181–187.
144. Konaka, A.; Kato, S.; Tanaka, A.; Kunikata, T.; Korolkiewicz, R.; Takeuchi, K. Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol. Res.* **1999**, *40*, 517–524.

**Table 1 : Diet modifications and microbiota transfer: effects on growth and EED development**

Preclinical Model	Growth	Gut hyperpermeability	Gut inflammation	Ref
<b>Caloric restriction (CR)</b>				
-15% CR	Weight loss	n/a	Lower MCP-1 mRNA (liver/adipose tissue)	[12]
-%25 CR	Weight loss	n/a	Thymus atrophy	[10]
-%30 CR	Weight loss	No gut hyperpermeability	Decreased systemic TNF $\alpha$ levels	[11]
<b>Intrauterine undernutrition</b>				
8% of protein in gestationnal rats / 20% in offspring	Low birth weight	Lower colonic ZO-1 mRNA expression	n/a	[17]
		No hyperpermeability to LPS		[17]
		<i>Ex vivo</i> colonic hyperpermeability to FSA		[18]
20% in gestating sows / low birth weight	Low birth weight	Lower villus length		[20]
		ileum/duodenum		[21]
				[22]
7.3% in gestating sows / 20% for piglets	Low birth weight	Lower villus/crypt ratio in piglets	Lower IL-6 and TNF- $\alpha$ mRNA in offspring (ileum)	[20]
Maternal protein restriction or energy restriction (60% vs	Low birth weight	n/a	lower C3, C4, IgG, and IgM concentration in plasma offspring	[23]

CT)			Decreased jejunal IL-2 and IL-6 mRNA expression in offspring	
<b>Protein energy undernutrition</b>				
0% of protein	Weight loss	Lower jejunal villus length	No difference in plasmatic $\alpha$ -1-Acid Glycoprotein	[36]
7% of protein	Weight loss	No villus atrophy/ <i>In vivo</i> hyperpermeability Lower jejunal ZO-1 and higher claudin-2 mRNA	Decreased MCP-1 macrophages release <i>in vitro</i>	[34]
4% protein	Weight loss	No hyperpermeability to large molecules Hyperpermeability to small molecules Lower colonic and ileal occludin	n/a n/a n/a	[35]
		n/a	Higher TNF- $\alpha$ , MCP-1 and IL1- $\beta$ production (liver)	[38]
			Leucopenia with higher systemic IL-10 production	[43]
			Lower CD-4 and TLR-4/MD-2 (macrophages)	
			Lower IL-6, TNF-a and IL1-B production by cultured cell from bone marrow, spleen	

			and peritoneum after <i>in vitro</i> LPS treatment	
2% protein	Weight loss	n/a	Higher MPO and LCN-2 production	[37]
			Decreased leucocyte, peripheral lymphocyte, monocyte and polynuclear cells levels	[42]
			Lower TLR-4 expression	[43]
			Lower mRNA expression of TNF- $\alpha$ by macrophage <i>in vitro</i>	
			Lower NF- $\kappa$ B activation <i>in vitro</i>	
0.7% of protein	Weight loss	n/a	Increased monocytes and macrophages number in bone marrow and blood	[39]
			Higher monocyte arginase expression	
RBD	Weight loss	Jejunal hyperpermeability	n/a	[48]
		Decreased jejunal claudin-3 tight junction protein expression		
		Jejunal villous, crypt atrophy		
		Lower ileal basal short circuit current		[49]
		Higher ileal claudin-2		

		and occludin mRNA expression		
		Ileal crypt atrophy No villous length difference		
M8	Weight loss	n/a	n/a	[57]
MAIZE	Weight loss	Small mucosal atrophy/ shorter villi & crypt	n/a	[53,56]
<b>Zinc deficiency</b>				
Zinc deficiency	Weight loss	No impact on villi/crypt ratio	No inflammation	[62]
		Decreased villi/crypt (EAEC -infected mice)	Decreased TNF-a, IL1-B and IL-6	
		No ileal hyperpermeability	Decreased ileal neutrophil infiltration	[65]
		No higher plasmatic endotoxin	Altered immune response to parasitic nematodes	
			Lower production of IL-4, Decreased level of IgE, IgG1	
			Lower eosinophils and impaired of antigen-presenting cells function	
<b>Microbiota transfert</b>				
cocktail of bacteria	Weight loss	Increased global intestinal permeability	Increased IL-6, MCP-1 (macrophages)	[34]
		Villus and crypt atrophy		



IgA+ bacteria  
consortium + M8 in  
gnotobiotic mice

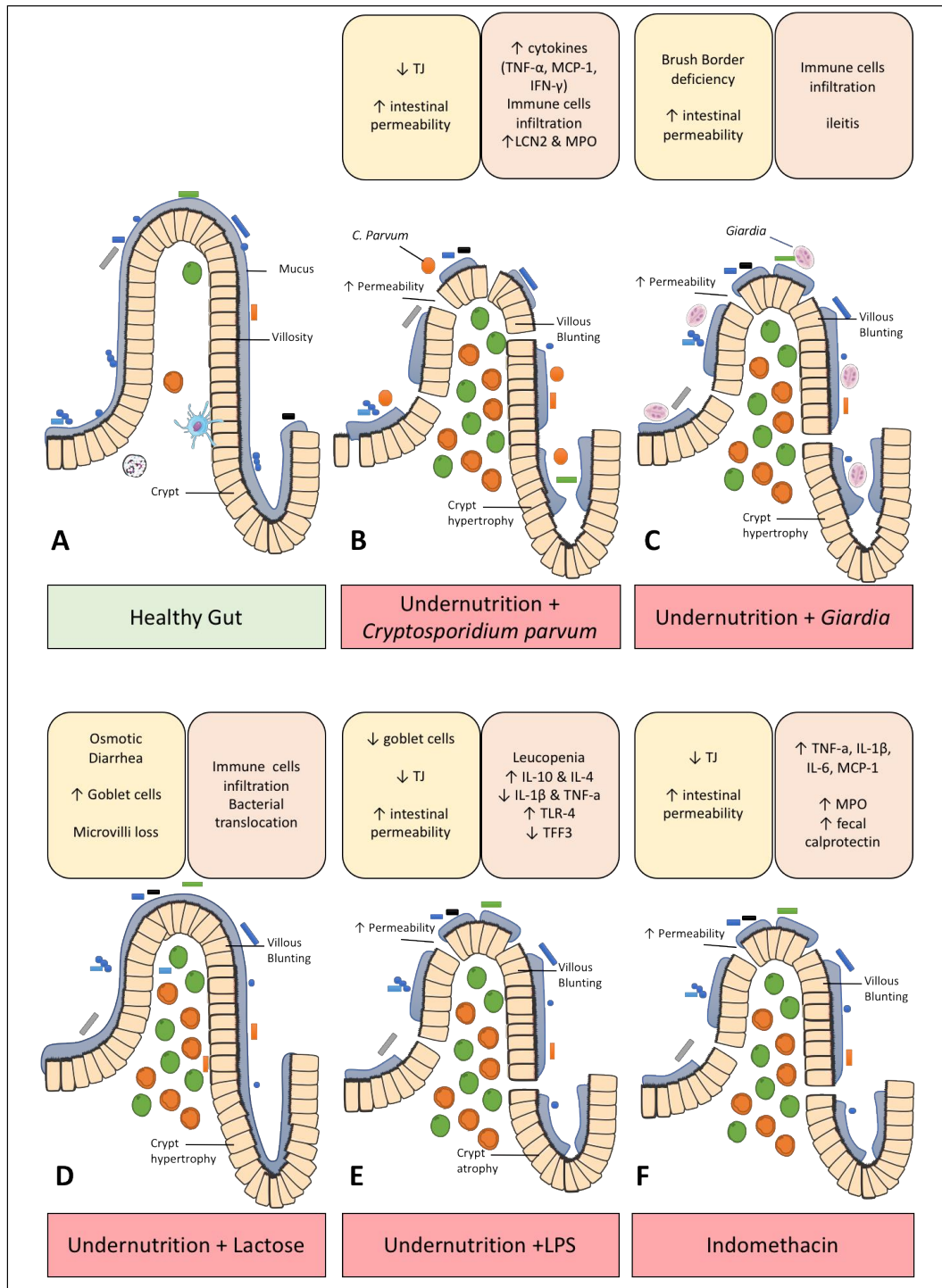
Higher  
weight loss

Villus and crypt  
atrophy

Bacterial translocation

[70]

Mucosal immune activation  
with neutrophils infiltration  
into lamina propria



**Figure 1: Experimental models of undernutrition and/or enteropathy and their respective impact on gut barrier function (yellow box) and inflammation (orange box).** (A) healthy gut. (B) Combination of undernutrition with *Cryptosporidium parvum* infection induced higher intestinal permeability, lower tight junction protein levels, villous blunting, crypt hyperplasia and inflammation (C) *Giardia* infection induced intestinal hyperpermeability, villous blunting, crypt hyperplasia, ileal inflammation and immune cell infiltration. (D) lactose-induced enteropathy induced villous blunting, increased goblet cells number, osmotic diarrhea, immune cell infiltration and bacterial translocation. (E) LPS-enteropathy in undernourished mice induced Intestinal hyperpermeability and lower tight junction levels, fewer goblet (F) Indomethacin-induced enteropathy induced intestinal hyperpermeability and intestinal inflammation. TJ: tight junction



## Article n°1

### Le développement d'un modèle murin de dénutrition sévère avec dysfonction entérique environnementale

**Contexte** La malnutrition aiguë (MA) est associée à une dysfonction entérique environnementale (DEE), caractérisée par (i) une hyperperméabilité intestinale, (ii) une inflammation de bas grade, (iii) une diminution de la taille des villosités et (iv) une malabsorption des nutriments, pouvant entraver l'efficacité des solutions de stabilisation ou nutritives.

**Objectif** Il existe peu de modèles précliniques combinant la MAS et la DEE et nous ne pouvons pas utiliser les modèles infectieux en raison d'un manque de disponibilité de la zone septique dans l'animalerie de l'UFR Santé. Cet article a pour objectif de mettre en évidence les différentes étapes de développement du modèle MAS-DEE.

**Méthodes** Différentes méthodes ont été utilisées pour parvenir à induire une entéropathie. Des souris C57BL/6 âgées de 3 semaines ont été utilisées dans toutes les étapes de développement du modèle de MAS-DEE. Expérience n°1 : les souris ont reçu soit un régime pauvre en protéines (5,8%) soit la moitié de la quantité d'un régime standard. Expérience n°2 : les souris ont été nourries avec un régime hypoprotéiné durant 2 semaines. A J11, elles ont reçu une injection intrapéritonéale d'une dose unique soit (i) de LPS (1mg/kg) soit (ii) d'indométacine (10mg/kg) afin d'induire une entéropathie. Expérience n°3 : les souris ont reçu un régime pauvre en protéines durant 5 jours et une dose par gavage d'indométacine (10mg/kg) à J1. Expérience n°4 : les souris ont reçu durant 3 semaines un régime hypoprotéiné avec un gavage quotidien d'une solution d'indométacine (1 ou 2,5 mg/kg) de J14 à J21. Pour chaque étape, le poids corporel et la longueur de la queue ont été mesurés afin d'évaluer la croissance staturo-pondérale. La perméabilité intestinale et l'inflammation ont été respectivement mesurées par le passage de FITC-Dextran dans le sang et par la mesure de la production de calprotectine fécale. L'architecture de la paroi intestinale a été observée par histologie.

**Principaux résultats** La restriction calorique et le régime hypoprotéiné ont induit un retard de croissance staturo-pondéral ( $p < 0,001$ ) sans impact sur l'intestin. La combinaison du régime hypoprotéiné et l'injection d'indométacine a induit une augmentation de la production de calprotectine fécale ( $p = 0,044$  vs LP). Par contre, la dénutrition associée à l'injection i.p. de LPS ou d'indométacine n'a pas eu d'effet sur la perméabilité intestinale. Afin d'amplifier l'effet de l'indométacine, l'administration répétée de l'indométacine durant une semaine associée à la

dénutrition protéique a permis de développer un retard de croissance staturo-pondéral (2-way ANOVA, pas d'interaction, effet du régime alimentaire  $p < 0,05$  - effet de l'indométacine  $p < 0,05$ ), une augmentation de la perméabilité intestinale globale ( $p = 0,0627$  vs SD,  $p = 0,0448$  vs LP) et une inflammation intestinale ( $p = 0,0012$ ). L'indométacine seule induit une diminution de l'épaisseur de la musculature ( $p < 0,05$  vs SD) et diminue l'expression en ARNm codant pour des protéines de jonctions serrées.

**Conclusion** La combinaison du régime pauvre en protéines et l'administration répétée d'indométacine par gavage a permis de développer un modèle préclinique présentant (i) un retard staturo-pondéral, (ii) une augmentation de la perméabilité intestinale, (iii) une inflammation intestinale et (iv) une déstructuration de l'architecture de la paroi intestinale. Ce modèle est un outil intéressant pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de cette entéropathie et pour tester de nouvelles solutions thérapeutiques ciblant la barrière intestinale.

## **Title Page**

### **Modeling undernutrition with enteropathy in mice**

**Authors :** Emmeline SALAMEH, Marine Jarbeau, Fanny B. Morel, Mamane Zeilani, Moutaz Aziz, Pierre Déchelotte, Rachel Marion-Letellier

#### **Affiliations**

Normandie Univ, INSERM Unit 1073, University of Rouen, France. (ES, MJ, PD, RML)

Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen, France. (ES, MJ, PD, RML)

Nutriset S.A.S , Nutrition Department, Malaunay, France. (ES, FM, MZ)

Rouen University Hospital, Nutrition unit, Rouen, France. (PD)

Rouen University Hospital, Anatomopathology, Rouen, France. (MA)

#### **Disclaimers**

**Corresponding author:** Dr Rachel Marion-Letellier (<https://orcid.org/0000-0002-3006-5943>)

**Address:** INSERM Unit 1073, 22 Boulevard Gambetta, 76000, Rouen, France

**Telephone number:** +33 235148242 **email address:** rachel.letellier@univ-rouen.fr

**Source of support:** This study was supported by Nutriset SAS and the National Association of Research and Technology (ANRT) within the framework of a CIFRE convention, and the Charles Nicole Foundation.

**Short Running head** A mouse model of undernutrition with enteropathy

## **Abbreviations**

**β2M:** β-2-microglobulin

**CLDN2:** Claudin-2

**CR:** Caloric Restriction

**EED:** Environmental Enteric Dysfunction

**FITC:** Fluorescein-isothiocyanate

**HES:** Hematoxylin-Eosin-Saffron

**INDO:** Indomethacin

**LP:** Low Protein

**LPS:** Lipopolysaccharides

**MCP-1:** Monocyte-chemoattractant protein 1

**SD:** Standard Diet

1 **Abstract (300 words)**

2 **Background** Undernutrition is a global health issue leading to 1 out of 5 all deaths in children under 5  
3 years. Undernutrition leads to child stunting and/or wasting and is often associated to environmental  
4 enteric dysfunction (EED). EED features include increased intestinal permeability and gut  
5 inflammation.

6 **Objective** We aimed to develop a novel murine model of undernutrition with these EED features.

7 **Design:** Post-weaning C57BL/6 mice were fed with low-protein diet alone (5% protein) or combined  
8 with a gastrointestinal insult trigger. Growth was assessed by body weight and tail length. Intestinal  
9 permeability and inflammation were respectively assessed by Fluorescein-isothiocyanate dextran  
10 (FITC-Dextran) flux and fecal calprotectin. Intestinal architecture was assessed by histology.

11 **Results:** Caloric restriction and low-protein diet (LP) for 3 weeks induced stunting and wasting  
12 ( $p < 0.001$  for all) in post-weaning mice and both diets had no intestinal impact. We therefore combined  
13 LP diet with a gastrointestinal insult trigger by liposaccharides (LPS) or indomethacin single  
14 administration. LPS did not significantly impact small intestine while indomethacin increased fecal  
15 calprotectin production ( $P = 0.044$  vs LP). To amplify indomethacin effects, we investigated its  
16 repeated administration in addition to LP diet and mice exhibited stunting and wasting (2-way  
17 ANOVA, no interaction, dietary effect, indomethacin effect, all  $P < 0.05$ ) with intestinal  
18 hyperpermeability ( $P = 0.0627$  vs SD,  $P = 0.0448$  vs LP) and gut inflammation ( $P = 0.0012$ ).  
19 Indomethacin had a significant impact on gut wall with decreased *muscularis* thickness ( $P < 0.05$  vs  
20 SD) and altered tight junctions proteins.

21 **Conclusion** Combination of 3-weeks LP diet with chronic indomethacin-induced enteropathy induced  
22 wasting, stunting and gut barrier dysfunction as observed in undernourished human with EED. As  
23 noninvasive methods for investigating gut function in undernourished children are scarce, the pre-  
24 clinical model we developed provides a unique opportunity to attempt to elucidate a few  
25 pathophysiological processes involved in EED and to identify novel therapeutic strategies.

26



27 **Keywords:** environmental enteric dysfunction, enteropathy, gut barrier, intestinal inflammation,  
28 intestinal permeability, undernutrition.

## 29 **Introduction**

30           According to UNICEF, undernutrition is a major public health problem in low-income  
31 countries (1). Undernutrition may lead to child stunting and/or wasting and is associated with an  
32 increased risk of impaired cognitive development, future chronic diseases, morbidity and mortality  
33 (1,2). Undernutrition is often associated with environmental enteric dysfunction (EED) and both  
34 contribute to a vicious cycle that perpetuates stunting and induces cognitive shortfalls. EED is  
35 characterized by gut barrier dysfunction reflected, among other features, by intestinal  
36 hyperpermeability, gut inflammation and villus blunting (3,4).

37           Murine models have been developed to dissect the impact of depleted diets in post-weaned  
38 mice (5,6). Two key depleted diets reflecting regimens common in children from impoverished areas  
39 are calories restricted (CR) and low protein (LP) diets. Mice exposed to both depletions exhibit weight  
40 loss and growth faltering (7–10). These models share features of undernutrition related to  
41 anthropometric measures observed in humans but their effects on gut barrier function are more  
42 debated (5,7,8). To impact gut barrier function in murine models, depleted diet has been combined  
43 with microbial infections to reflect environmental exposure experienced by malnourished children.  
44 Microbial challenges inducing gut inflammation include bacterial cocktail (7) or parasites such as  
45 *Cryptosporidium parvum* or *Giardia* (11,12). These murine models are relevant to EED but their  
46 reproducibility may be difficult because of differential microbial proliferation. In addition,  
47 inflammation induced by pathogen can induce more drastic inflammatory phenotypes compared to  
48 subclinical features observed in human EED.

49           We thus aimed to develop a novel murine model of undernutrition exacerbating EED features  
50 by dissecting the respective impact of undernutrition and enteric insults on gut barrier function.  
51 Undernutrition was investigated through CR or LP diet. Small intestinal injury was induced by  
52 bacterial liposaccharides (LPS) or indomethacin. We chose LPS because serum anti-LPS  
53 immunoglobulins in children is elevated, associated to poor growth outcomes(13–15). Moreover, LPS  
54 is also well known to induce gut inflammation via Toll Like Receptor activation *in vivo* and *in vitro*  
55 (16). Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, is commonly used to induce enteropathy

56 in normo-nourished mice (17,18). The aim of our study was to establish a simplistic model of  
57 undernutrition with EED features, what represent a goal for research applications and further  
58 therapeutic approaches.

59

60 **Material and methods**

61 **Ethics**

62 Animal care and experimentation complied with both French and European community regulations  
63 (Official Journal of the European Community L 358, 18/12/1986). Investigators are authorized by the  
64 local ethic comity CENOMEXA (AFADIS#6185). Mice were ethanized if weight loss exceeded 25%  
65 during 3 consecutive days.

66

67

68 **Animals and treatment regimen**

69 Post weaning three-week-old male mice C57BL/6 were ordered for each experiment (Janvier, Le  
70 Genest-Saint-Isle, France). They were acclimatized for 1 week and housed to a cage. During this  
71 period, they received standard diet *ad libitum* (A03 21.4% protein, 5.1% fat - SAFE, Augy, France)  
72 and had access to tap water. All experiments took place in a climate-controlled facility with 12/12  
73 light/dark cycle and mice were randomized per cage and assigned to a specific regimen. At the end of  
74 each protocol, mice were euthanized by intraperitoneal injection of ketamine (40mg/kg) and  
75 chlorpromazine (1mg/kg). Samples were stored immediately at -80°C.

76

77 **Experiment 1 - Effect of protein or caloric restriction:** Mice were fed with standard diet (SD,  
78 21.4% protein, 5.1% fat, n=20 - SAFE), isocaloric low protein (LP, 5.8% protein, 6% fat, n=20 -  
79 SAFE) or calorie restriction (CR) diet (-50%) diet for 21 days (Table 1 – Figure 1a).

80

81 **Experiment 2 - Impact of undernutrition and liposaccharides or indomethacin intraperitoneal**  
82 **single injection:** Mice were fed with SD or isocaloric LP diet for 14 days. At D11, mice received a  
83 single intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LP+LPS, 1mg/kg, n=20) (Serotype O111:B4,  
84 Sigma Aldrich) or indomethacin (LP+INDO, 10mg/kg, n=20, Sigma Aldrich) diluted in water (Figure  
85 2a).

86

87 **Experiment 3 - Impact of undernutrition and single gavage of indomethacin:** Mice were fed with  
88 SD or isocaloric LP diet for 5 days. At D1, a single gavage of indomethacin (10mg/kg) diluted in 1%  
89 carboxymethylcellulose (Sigma Aldrich) was performed (Figure 3a).

90

91 **Experiment 4 - Impact of undernutrition and repeated gavages of indomethacin** Mice were fed  
92 with standard or isocaloric low protein diet for 21 days. At D14, indomethacin (1 or 2.5 mg/kg, n=10  
93 for each group) diluted in Dimethyl Sulfoxide (18). Gavages were performed once a day for 7 days  
94 (Figure 4a).

95

96 **Growth and Body Weight** Body weight was recorded every two days and tail length was measured to  
97 assess linear growth at the end of the protocol.

98

99 **Fecal calprotectin concentration** Mice feces from the colon were collected at the end of each  
100 experiment, weighted, homogenized in 500  $\mu$ L PBS + 1% inhibitors (protease and phosphatase  
101 inhibitor cocktail, Sigma Aldrich) and centrifuged at 13000 g, 20 min. Supernatant was stored at -  
102 80°C. Fecal calprotectin measurement was performed on supernatants using a S100A8/S100A  
103 calprotectin ELISA kit following manufacturer's instructions (R&D System, Mineapolis, USA).

104 Concentration was determined by assessing the OD 450nm using a plate reader (Tecan, Männedorf,  
105 Suisse), comparing with a standard curve of known concentration of calprotectin.

106

107 **Intestinal permeability assessment** Jejunal permeability was assessed by measuring 4kDa  
108 Fluorescein-isothiocyanate (FITC, Sigma Aldrich)-dextran mucosal to serosal flux level in Ussing  
109 chambers (Harvard Apparatus, Holliston, United States) as previously described (19). Intestinal  
110 permeability was assessed by serum FITC-dextran flux concentration (7). Briefly, mice were fasted 6  
111 hours before FITC-dextran gavage (60mg/kg). Three hours post gavage, plasma was collected *post-*  
112 *mortem*. FITC-dextran fluorescence level was measured by using a 96-well black plate reader  
113 (Chameleon V - Hidex, Turku, Finland) read with the excitation of 485nm and emission of 530 nm. A  
114 standard curve was used to convert values to concentration.

115

116 **RT-q-PCR** First, 1.5 µg total RNA into cDNA by using 200 units of SuperScript™ II Reverse  
117 Transcriptase (ThermoFischer, Waltham, Massachussets, USA) was used for Reverse Transcriptase  
118 as previously described (20). SYBR™ Green technology on BioRad CFX96 real time PCR system  
119 (BioRad Laboratories, Marnes la Coquette, France) was used to perform qPCR in duplicate for each  
120 jejunal sample as previously described (20). Sense and anti-sense primers for GAPDH (5'-  
121 CATCACTGCCACTCAGAAGA-3' ; 5'-AAGTCACAGGAGACAACCT-3'), 18S (5'-  
122 TGCGAGTACTCAACACCAACA-3' ; 5'-TTCCTCAACACCACATGAGC-3') and β-2-  
123 microglobulin (β2M 5'-GCCGAACATACTGAACTGCTAC-3' ; 5'-  
124 GCTGAAGAACATATCTGACATCTC-3') were used as reference genes and specific primers for  
125 Claudin-2 (CLDN2 5'-ATACTACCCTTTAGCCCTGACCGAGA-3' ; 5'-  
126 CAGTAGGAGCACACATAACAGCTACCAC-3'), Occludin (OCCLUDIN 5'-  
127 CAGTAGGAGCACACATAACAGCTACCAC-3' ; 5'-CTGCAGACCTGCATCAAAAT-3')  
128 Monocyte

129 chemoattractant protein 1 (MCP-1 5'-TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA-3' ; 5'-  
130 GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT-3') and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  5'-  
131 TGTCTACTCCTCAGAGCCCC-3' ; 5'-TGAGTCCTTGATGGTGGTGC3').

132

133 **Histology** Jejunum samples from experiment 4 were embedded in paraffin. Sections of 4 mm were cut  
134 with a microtome and stained with a solution of hematoxylin-eosin-saffron (HES) as previously  
135 described (21). Samples were blinded and analyzed with photonic VisionTek<sup>®</sup> Live Digital  
136 Microscope (Sakura, The Netherland). Histological analysis of jejunal villi height ( $\mu\text{m}$ ), crypt depth  
137 ( $\mu\text{m}$ ) and jejunal *muscularis* thickness ( $\mu\text{m}$ ) were obtained with VisionTeck Software (Sakura).

138

139 **Statistics** Results were expressed as mean  $\pm$  standard error mean (SEM) and were compared using  
140 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, United States). Inter-individual comparisons  
141 between two groups were performed with parametric Student t test or non-parametric Mann-Whitney  
142 test, and ANOVA followed by Tukey post-tests for more than two groups. Pvalue<0.05 was  
143 considered significant. Indomethacin and LP diet effects were analyzed by two-way analysis of  
144 variance for repeated measures with Tukey's *post hoc* tests.

145

146 **Results**

147 **Effect of a three-weeks low protein diet and caloric restriction on growth and barrier function**  
148 **(Figure 1)**

149 We first characterized the impact of 50% CR or LP diet on growth and gut barrier function in post-  
150 weaning mice compared to mice fed with SD (Figure 1a). LP and CR groups had a lower weight  
151 compared to SD group (-53% for LP, -43% for CR,  $P < 0.0001$  for both *vs* CT - Figure 1b and 1c). Mice  
152 fed with the LP diet had a lower weight over time compared to the caloric restriction group ( $10.6\text{g} \pm$   
153  $0.4$  for LP,  $13.0\text{g} \pm 0.4$ ,  $P < 0.0001$  - Figure 1c). Both groups had also a significantly shorter tail length  
154 (-16.3% for LP, -12.4% for CR,  $P < 0.0001$  for both *vs* SD - Figure 1d). No impact on jejunal  
155 permeability was observed (-20.5% for LP, +35.2% for CR,  $P = 0.8$  *vs* SD for both - Figure 1e). No  
156 significant changes in fecal calprotectin were found among groups (-18.9% for LP, -11.9% for CR,  
157  $P > 0.05$  *vs* SD for both - Figure 1f).

158

159 **Effect of a two-weeks low protein diet combined with lipopolysaccharide or indomethacin**  
160 **intraperitoneal single injection on growth and barrier function (Figure 2)**

161 We thus decided to associate low-protein diet to a gastrointestinal damage trigger and investigated two  
162 approaches: liposaccharides (LPS) or indomethacin (Figure 2a). LP groups, including LP+LPS and  
163 LP+INDO groups, had a lower body weight (-37.2% for LP, -38.6% for LP+LPS, -35.3% for  
164 LP+INDO,  $P < 0.0001$  each *vs* SD - Figure 2b and 2c) and shorter tail length (-8% for LP, -10% for  
165 LP+LPS, -9% for LP+INDO,  $P < 0.0001$  each *vs* SD - Figure 2d). In combination with low-protein diet,  
166 LPS and indomethacin administration did not worsen growth deficit (Figure 2d). LPS administration  
167 did not affect intestinal permeability (+21.3% for LP+LPS,  $P = 0.8$  *vs* SD - Figure 2e) or fecal  
168 calprotectin levels (-15% for LP+LPS,  $P = 0.4$  *vs* SD - Figure 2f). Intraperitoneal injection of  
169 indomethacin did not modulate intestinal permeability (+94.7% for LP+INDO,  $P = 0.4$  *vs* SD - Figure  
170 2e) but increased fecal calprotectin levels compared to mice only fed with LP diet (+170% for  
171 LP+INDO,  $P = 0.0044$  *vs* LP - Figure 2f).



172

173 **Effect of a single indomethacin gavage with 5-days LP diet on growth and barrier function**  
174 **(Figure 3)**

175 As indomethacin injection had an impact on intestinal inflammation, we thus speculated that oral  
176 gavage with indomethacin may have a stronger effect on intestinal permeability (Figure 3a) (17). Mice  
177 fed with low-protein diet for 5 days gained less weight than mice fed with SD (-24% for LP,  $P < 0.0001$   
178 vs SD - Figure 3b and 3c). Five-day LP diet was not sufficient to impact linear growth (-2.3% for LP,  
179  $P = 0.1174$  vs SD) as shown by the absence of difference in tail length among groups (Figure 3d). By  
180 contrast, 5-days-LP diet decreased fecal calprotectin (-38% for LP,  $P = 0.0011$  vs SD - Figure 3f) and  
181 induced intestinal hyperpermeability (+32% for LP,  $P = 0.03$  vs SD - Figure 3e). No additional effect of  
182 oral indomethacin administration was observed on growth parameters or EED features (Figure 3e and  
183 3f).

184

185 **Effect of a three-weeks LP diet combined with repeated indomethacin gavages on growth and**  
186 **barrier function (Figure 4,5 and 6)**

187 Daily oral indomethacin at 1 or 2.5 mg/kg (Figure 4a) did not induce mice mortality. LP diet  
188 or oral indomethacin treatment had a significant impact on body weight or tail length (2-  
189 way ANOVA, no interaction, dietary effect, indomethacin effect, all  $P < 0.05$ ) (Figure 4b, 4c  
190 and 4d). Combination of LP diet with indomethacin had also a significant impact on EED  
191 features: increased intestinal permeability (+150% for LP+INDO2.5,  $P = 0.0418$  vs LP - Figure  
192 4e) and gut inflammation assessed by fecal calprotectin (+496% for LP+INDO2.5,  $P = 0.0012$   
193 vs SD) (Figure 4f). Combination of 3 weeks-LP diet with one week daily oral gavage of  
194 indomethacin significantly decreased claudin-2 by 33% ( $P = 0.0336$  vs SD - Figure 5a) and  
195 decreased occludin mRNA levels by 26% ( $P = 0.0587$  vs SD - Figure 5b). Combination of LP  
196 diet with oral indomethacin at 2.5mg/kg significantly increased MCP-1 mRNA level (+829%

197 for LP+INDO2.5, P=0.02 vs SD) compared to mice fed with SD diet (Figure 5c) without  
198 impact on TNF $\alpha$  mRNA levels (Figure 5d). Indomethacin gavages (1mg/kg) induced villus  
199 blunting (-20% for SD+INDO1, P=0.0186 vs SD - Figure 6b). No significant impact of LP  
200 diet or LP diet combined with indomethacin gavage in villi length or crypt depth was detected  
201 (Figure 6b and 6c). LP diet and indomethacin combination induced *muscularis* thickness  
202 reduction (-29% for LP+INDO1, P=0.0254 vs SD; -39% for LP+INDO2.5; P=0.0283 vs SD -  
203 Figure 6c) while LP alone did not.

204

## 205 **Discussion**

206

207 In the present study, we developed a murine model combining undernutrition with enteropathy  
208 resulting in (i) wasting and stunting, (ii) inflammation and (iii) gut hyperpermeability .

209

210 We first investigated the impact of undernutrition alone for three weeks by limiting the  
211 amount of food by 50% or by feeding mice with a LP diet. Both approaches had a significant impact  
212 on growth by reducing body weight and exhibiting shorter tails. These approaches had no influence on  
213 gut barrier function or intestinal permeability. Similarly, rats fed with LP diet (4% protein) for 20 days  
214 had growth retardation without effect on colonic or ileum permeability to macromolecules (8). As  
215 dietary protein deficiency alone was not sufficient to impact gut barrier, we then investigated the  
216 combination of LP diet with a compound triggering a gut barrier insult. We thus explored two  
217 approaches: bacterial LPS and indomethacin. Bacterial LPS is the main cell wall component of gram-  
218 negative bacteria and increased anti-LPS Immunoglobulins concentrations in children are associated to  
219 poor growth outcomes (14,15). In our experimental design, intraperitoneal injection of LPS in  
220 combination with LP diet, did not induce EED features. We thus speculated that undernutrition may  
221 alleviate inflammatory response to a LPS challenge. Indeed, Neyestani *et al.* showed altered immunity  
222 response after 14 days with LP diet (2%) in weanling mice (22). This mechanism has already been  
223 described in central inflammation (23). Actually, LP diet during pregnancy decreased offspring  
224 inflammatory response to acute LPS in the hypothalamus (23). Indomethacin, a non-steroidal anti-  
225 inflammatory drug has been used to induce enteropathy in experimental models (17,18). Indomethacin  
226 challenge at 10mg/kg in malnourished mice did not accentuate body weight loss or growth faltering  
227 but increased fecal calprotectin levels compared to mice fed with LP diet. Similar results on intestinal  
228 inflammation were found in normonourished mice from day 1 to day 4 after a single injection of  
229 indomethacin at the same dose (24,25). Otherwise, compared to indomethacin- treated mice,  
230 normonourished mice encountered the same fecal calprotectin levels suggesting altered immunity

231 response as previously reported in undernourished mice (22). No impact of indomethacin at 10mg/kg  
232 in gut permeability was observed in malnourished mice in the present study.

233 To accentuate the effect of indomethacin on gastrointestinal tract, we orally exposed mice to a  
234 single gavage of indomethacin before LP diet started and studied the impact one week later. LP diet  
235 induced body weight loss and lower fecal calprotectin production. Brown *et al* study showed no  
236 impact of 3 weeks of LP diet (7%) in weanling mice on fecal calprotectin levels (7). A clinical study  
237 demonstrated higher serum calprotectin production in patients receiving high protein content in  
238 breakfast (26). No additional effects of oral indomethacin administration were observed on growth  
239 parameters or EED features. Concerning intestinal permeability, Jacob *et al.* observed higher intestinal  
240 permeability 1-6 hours in rats receiving indomethacin gavage at 20mg/kg and returned to normal 4  
241 days post treatment (27) We thus hypothesised that indomethacin-induced intestinal permeability may  
242 be transient.

243 To strengthen indomethacin's impact on gut barrier, we then set up repeated gavages  
244 of indomethacin. Indeed, Whitfield-Cargile *et al.* demonstrated that 6 days of repeated  
245 indomethacin gavage at 5mg/kg led to enteropathy in normonourished mice (18). Post-  
246 weaning mice were therefore fed with LP diet or SD diet for 3 weeks. Dose-response of oral  
247 indomethacin from 1 to 2.5mg/kg was investigated. In this model, LP diet or oral  
248 indomethacin treatment had a significant impact on body weight and tail length.  
249 Combination of LP diet with indomethacin also had a significant impact on EED features:  
250 increased intestinal permeability and gut inflammation assessed by fecal calprotectin. This is  
251 in accordance with Whitfield-Cargile *et al.* showing that chronic indomethacin gavage at  
252 5mg/kg for 6 days increased fecal calprotectin (18).

253 Next, we confirmed gut barrier dysfunction by analysing tight junction proteins  
254 mRNA levels of occludin and claudin-2 and cytokine mRNA levels of MCP-1. Combination  
255 of 3 weeks LP diet with chronic oral gavage of indomethacin significantly decreased claudin-

256 2 and occludin mRNA levels and therefore confirmed gut barrier dysfunction. These results  
257 are in accordance with the study of *Eyzaguirre-Velasquez et al.* showing a reduced ileal and  
258 colonic occludin expression in protein-deprived rats also observed in *Bartelt et al.* study (8,9).  
259 Combination of LP diet with oral indomethacin at 2.5 mg/kg increased MCP-1 mRNA level  
260 compared to mice fed with SD diet as previously described by *Harusato et al.* in C57BL/6  
261 normonourished mice (28).

262 In our study, LP diet did not impact villous height or crypt depth and similar results  
263 were observed after 26-days fed with LP diet (2%) or 3-weeks fed with LP diet (7%) (7,29).  
264 Indomethacin was able to induce villous blunting as previously shown (18,30).

265 Our present murine model reflects features observed in children with undernutrition  
266 and EED. LP diet reflects the poor nutritional environment leading to undernutrition. LP diet  
267 was able to induce linear growth failure but was not sufficient alone to impact gut barrier  
268 function. By repeated exposure with indomethacin, a gut barrier dysfunction was induced.  
269 Higher intestinal permeability was observed as described in human EED (31) and this effect is  
270 confirmed by decreased mRNA levels encoding for tight junction proteins. Fecal calprotectin,  
271 a proposed biomarker in EED (32), was also increased in the present model. Human EED is  
272 also characterized by inflammatory cell infiltrate (33) and we detected increased jejunal  
273 mRNA levels for MCP-1 suggesting this latter in our model.

274

275 As higher endotoxins levels have been observed in EED (13), we initially speculated  
276 that LPS would be more relevant to use than indomethacin in order to induce EED. Through  
277 our experiments, we finally demonstrated the opposite. Indomethacin use may not reproduce  
278 identical mechanisms involved in EED etiology and enabled to display many EED features

279 while LPS did not. In addition, use of indomethacin enables an easy and reproducible model  
280 with a more controlled inflammatory response that may compare to subclinical symptoms  
281 found in human pathophysiology.

282 In conclusion, we developed a murine model of undernutrition with EED features  
283 (intestinal inflammation and hyperpermeability) as observed in humans (Figure 7).  
284 Understanding the physiological mechanisms involved during an episode of undernutrition  
285 associated to EED is a critical step to develop novel therapeutic strategies. Obvious  
286 limitations are associated to investigate gut function in undernourished children, and  
287 particularly the lack of precise non-invasive methods. A stable and reproducible animal model  
288 is therefore an interesting and affordable tool to elucidate pathophysiological processes and  
289 potentially develop novel therapeutic strategies application.

290 **Acknowledgments**

291

292 We would like to thank Dr Canaan M. Whitfield-Cargile and Prof Noah D. Cohen for their technical  
293 advices concerning indomethacin gavage.

294

295 **Conflict of interest statement**

296 None of the authors had a conflict of interest.

297

298 **Author contribution**

299 The authors' responsibilities were as follows—ES, RML, FM, MZ and PD: designed the research; ES  
300 and MJ conducted animal experiments and analysis; MA and ES conducted histological  
301 measurements; RML and PD: conducted the research; ES, MJ and RML: analyzed data or performed  
302 the statistical analysis; ES and RML wrote the manuscript; and all authors: read and approved the final  
303 manuscript.

## References

1. Unicef, WHO, The World Bank Group. Joint Child malnutrition estimates Levels and Trends 2018 edition. Version current 2018 May. Internet: <https://www.who.int/nutgrowthdb/estimates2017/en/>
2. Khara T, Mwangome M, Ngari M, Dolan C. Children concurrently wasted and stunted: A meta-analysis of prevalence data of children 6-59 months from 84 countries. *Matern Child Nutr.* 2018;14:e12516.
3. Humphrey JH. Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing. *The Lancet.* 2009;374:1032–5.
4. Budge S, Parker AH, Hutchings PT, Garbutt C. Environmental enteric dysfunction and child stunting. *Nutr Rev.* 2019;77:240–53.
5. Mayneris-Perxachs J, Bolick DT, Leng J, Medlock GL, Kolling GL, Papin JA, Swann JR, Guerrant RL. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype. *Am J Clin Nutr.* 2016;104:1253–62.
6. Bartelt LA, Bolick, DT, Guerrant RL. Disentangling Microbial Mediators of Malnutrition: Modeling Environmental Enteric Dysfunction. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* 2019;
7. Brown EM, Wlodarska M, Willing BP, Vonaesch P, Han J, Reynolds LA, Arrieta M-C, Uhrig M, Scholz R, Partida O, et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. *Nature Communications.* 2015;6:7806.
8. Eyzaguirre-Velasquez J, Olavarria-Ramirez L, Gonzalez-Arancibia C, Diaz-Merino C, Ariz R, Lopez S, Quiroz W, Beltran CJ, Bravo JA, Julio-Pieper M. Protein Malnutrition During Juvenile Age Increases Ileal and Colonic Permeability in the Rat. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* 2016;00:1–7.
9. Bartelt LA, Bolick DT, Kolling GL, Roche JK, Zaenker EI, Lara AM, Noronha FJ, Cowardin



CA, Moore JH, Turner JR, et al. Cryptosporidium Priming Is More Effective than Vaccine for Protection against Cryptosporidiosis in a Murine Protein Malnutrition Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10:1–29.

10. Núñez IN, Galdeano CM, Carmuega E, Weill R, de Moreno de LeBlanc A, Perdigón G. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein-energy malnutrition. *Br J Nutr*. 2013;110:500–8.

11. Coutinho BP, Oriá RB, Vieira CMG, Sevilleja JE a D, Warren C a, Maciel JG, Thompson MR, Pinkerton RC, Aldo a M, Guerrant RL. Cryptosporidium Infection Causes Undernutrition and Conversely, Weanling Undernutrition Intensifies Infection. *J Parasitol*. 2008;94:1225–1232.

12. Bartelt LA, Bolick DT, Mayneris-Perxachs J, Kolling GL, Medlock GL, Zaenker EI, Donowitz J, Thomas-Beckett RV, Rogala A, Carroll IM, et al. Cross-modulation of pathogen-specific pathways enhances malnutrition during enteric co-infection with *Giardia lamblia* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 2017;13:e1006471.

13. Campbell DI, Elia M, Lunn PG. Growth faltering in rural Gambian infants is associated with impaired small intestinal barrier function, leading to endotoxemia and systemic inflammation. *J Nutr*. 2003;133:1332–8.

14. Lauer JM, Duggan CP, Ausman LM, Griffiths JK, Webb P, Agaba E, Nshakira N, Tran HQ, Gewirtz AT, Ghosh S. Biomarkers of maternal environmental enteric dysfunction are associated with shorter gestation and reduced length in newborn infants in Uganda. *Am J Clin Nutr*. 2018;108:889–96.

15. McDonald CM, Manji KP, Gosselin K, Tran H, Liu E, Kisenge R, Aboud S, Fawzi WW, Gewirtz AT, Duggan CP. Elevations in serum anti-flagellin and anti-LPS Igs are related to growth faltering in young Tanzanian children. *Am J Clin Nutr*. 2016;103:1548–54.

16. Nighot M, Rawat M, Al-Sadi R, Castillo EF, Nighot P, Ma TY. Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Permeability Is Mediated by TAK-1 Activation of IKK and MLCK/MYLK Gene. *Am J Pathol*. 2019;189:797–812.

17. Han Y-M, Park J-M, Kang JX, Cha J-Y, Lee H-J, Jeong M, Go E-J, Hahm KB. Mitigation of indomethacin-induced gastrointestinal damages in fat-1 transgenic mice via gate-keeper action of  $\omega$ -3-polyunsaturated fatty acids. *Scientific Reports*. 2016;6:33992.
18. Whitfield-Cargile CM, Cohen ND, Chapkin RS, Weeks BR, Davidson LA, Goldsby JS, Hunt CL, Steinmeyer SH, Menon R, Suchodolski JS, et al. The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes*. 2016;7:246–261.
19. Salameh E, Meleine M, Gourcerol G, do Rego J-C, do Rego J-L, Legrand R, Breton J, Aziz M, Guérin C, Coeffier M, et al. Chronic colitis-induced visceral pain is associated with increased anxiety during quiescent phase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2019;
20. Charpentier C, Chan R, Salameh E, Mbodji K, Ueno A, Coeffier M, Guérin C, Ghosh S, Savoye G, Marion-Letellier R. Dietary n-3 PUFA May Attenuate Experimental Colitis. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:8430614.
21. Melchior C, Loeuillard E, Marion-letellier R, Nicol L, Mulder P, Aziz M, De P, Vera P, Bo C. Magnetic Resonance Colonography for Fibrosis Assessment in Rats with Chronic Colitis. *PLoS ONE*. 2014;9.
22. Neyestani TR, Woodward WD, Hillyer L. Serum Levels of Th2-Type Immunoglobulins are Increased in Weanling Mice Subjected to Acute Wasting Protein-Energy Malnutrition. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2004;3:1–6.
23. Grissom NM, George R, Reyes TM. Suboptimal nutrition in early life affects the inflammatory gene expression profile and behavioral responses to stressors. *Brain Behav Immun*. 2017;63:115–26.
24. Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Mizuno S, Rikitake Y. Preventative effects of sodium alginate on indomethacin-induced small-intestinal injury in mice. *International Journal of Medical Sciences*. 2016;13:653–663.

25. Narimatsu K, Higashiyama M, Kurihara C, Takajo T, Maruta K, Yasutake Y, Sato H, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 agonists ameliorate indomethacin-induced murine ileitis by suppressing the TLR4 signaling. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30:1610–7.
26. Ohlsson B, Roth B, Larsson E, Höglund P. Calprotectin in serum and zonulin in serum and feces are elevated after introduction of a diet with lower carbohydrate content and higher fiber, fat and protein contents. *Biomed Rep*. 2017;6:411–22.
27. Jacob M, Foster R, Sigthorsson G, Simpson R, Bjarnason I. Role of bile in pathogenesis of indomethacin-induced enteropathy. *Archives of Toxicology*. 2007;81:291–8.
28. Harusato A, Naito Y, Takagi T, Yamada S, Mizushima K, Hirai Y, Horie R, Inoue K, Fukumoto K, Hirata I, et al. Inhibition of Bach1 ameliorates indomethacin-induced intestinal injury in mice. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60 Suppl 7:149–54.
29. Costa LB, JohnBull EA, Reeves JT, Sevilleja JE, Freire RS, Hoffman PS, Lima AAM, Oriá RB, Roche JK, Guerrant RL, et al. Cryptosporidium-malnutrition interactions: mucosal disruption, cytokines, and TLR signaling in a weaned murine model. *J Parasitol*. 2011;97:1113–20.
30. Ilahi M, Khan J, Inayat Q, Abidi TS. Histological changes in parts of foregut of rat after indomethacin administration. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2006;18:29–34.
31. Merchant AT, Jones C, Kiure A, Kupka R, Fitzmaurice G, Herrera MG, Fawzi WW. Water and sanitation associated with improved child growth. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57:1562–8.
32. George CM, Burrowes V, Perin J, Oldja L, Biswas S, Sack D, Ahmed S, Haque R, Bhuiyan NA, Parvin T, et al. Enteric Infections in Young Children are Associated with Environmental Enteropathy and Impaired Growth. *Trop Med Int Health*. 2018;23:26–33.
33. Ramakrishna BS, Venkataraman S, Mukhopadhyaya A. Tropical malabsorption. *Postgrad Med J*. 2006;82:779–87.

**Table 1:** Standard and Low-protein diet composition

	<b>Control Diet (SD)</b>		<b>Low Protein Diet (LP)</b>	
	<b>g%</b>	<b>Kcal%</b>	<b>g%</b>	<b>Kcal%</b>
<b>Protein</b>	21.4	27.3	5.8	6.9
<b>Carbohydrates</b>	52.0	66.2	72	85.9
<b>Fat</b>	5.1	6.5	6	7.2
<b>Total</b>		100		100
<b>Kcal/g</b>	3.395		3.395	

## Legends for figures

**Figure 1: Growth, intestinal inflammation and permeability assessment in C57BL/6 mice fed a low protein, calorie restrictive or isocaloric standard diet.** (a) 3-weeks-old mice were fed with standard, isocaloric low protein or 50% calorie restrictive diet post weaning for 21 days. (b) Body weight was recorded every two days until the end of the experimentation (n=20 per group). Plots represent the mean  $\pm$ SEM (\*\*P<0.001; 2-Way ANOVA). At D21, (c) body weight (n=20 per group) and (d) tail length (n=20 per group) were measured. Bars indicate the mean  $\pm$ SEM One-way analysis of variance with *post hoc* Tukey's test was performed (\*\*P<0.0001). (e) Bars indicate the mean  $\pm$ SEM of the jejunal concentration of FITC into muscular side after 3h after the beginning of *ex vivo* measurement of jejunal permeability using Ussing chamber at D21 (n=20 per group). Kruskal Wallis test with *post hoc* Dunn's Multiple Comparison Test was performed. (f) Bars indicate the concentration of fecal calprotectin in mice at D21(n=20 per group). One-way analysis of variance with *post hoc* Tukey's test was used. SD, Standard diet; LP, Low protein diet; CR, Caloric Restriction.

**Figure 2: Growth, intestinal inflammation and permeability assessment in C57BL/6 mice fed a low protein in combination with lipopolysaccharide or indomethacin i.p. injection.** (a) 3-weeks-old mice were fed with standard or isocaloric low protein diet post weaning during 14 days. At day 11, mice received a single intraperitoneal injection of LPS (1mg/kg) or indomethacin (10mg/kg). (b) Body weight was recorded at D1, D4, D6, D8 and every day from D11 until the end of the experimentation (n=20 per group). Plots represent the mean  $\pm$ SEM (\*\*P<0.001 vs SD, Two Way ANOVA). At D14, (c) weight (n=20 per group) and (d) tail length (n=20 per group) were calculated. Bars indicate the mean  $\pm$ SEM. One-way analysis of variance with *post hoc* Tukey's test was performed (\*\*P<0.0001). (e) Bars indicate the mean  $\pm$ SEM of the FITC concentration serum (assessed 3 h post *per os* administration; n=20 per group). Kruskal Wallis test with *post hoc* Dunn's multiple comparison test was performed (f) Bars indicate the concentration of fecal calprotectin in mice at D21 (n=20 per group). Unpaired t-test (\*p=0.0423) or Mann-Whitney test was performed (\*\*p=0.0044). SD,

Standard diet; LP, Low protein diet; LP+LPS, Low protein diet + i.p. injection of lipopolysaccharides; LP+INDO, LP + i.p. injection of indomethacin.

**Figure 3: Growth, intestinal inflammation and permeability assessment in C57BL/6 mice fed a low protein combination with a single indomethacin gavage.** (a) 3-weeks-old mice were fed with standard or low protein diet for 5 days. At day 1, a single gavage of indomethacin (10mg/kg) was performed. (b) Body weight was recorded every day until the end of the experimentation (n=20 per group). Plots represent the mean  $\pm$ SEM (\*\*P<0.0001, Two Way ANOVA). At D5, (c) body weight (n=20 per group) and (d) tail length (n=20 per) were measured. Bars indicate the mean  $\pm$ SEM Kruskal-Wallis test with *post hoc* Dunn's test was performed (\*\*P<0.0001). (e) Bars indicate the mean  $\pm$ SEM of the serum FITC concentration (assessed 3 h post *per os* administration; n=20 per group). One-way analysis of variance with *post hoc* Tukey's test (\*\*P<0.0041) and unpaired t-test (\*p<0.05) was performed (f) Bars indicate the concentration of fecal calprotectin in mice at D21 (n=20 per group). Mann-Whitney test was performed (\*\*p=0.0011; \*p=0.0037) SD, Standard diet; LP, Low protein diet; LP+INDO, LP + i.p. injection of indomethacin.

**Figure 4: Growth, intestinal inflammation and permeability assessment in C57BL/6 mice fed a low protein or isocaloric standard diet combined with chronic indomethacin gavages.** (a) 3-weeks-old mice were fed with standard or low protein diet for 21 days. At day 14, indomethacin (1 or 2.5 mg/kg) gavage was performed once a day for 7 days. (b) Body weight was recorded every day from D1 until the end of the experimentation (n=10 per group). Plots represent the mean  $\pm$ SEM (\*\*P<0.001, Two way ANOVA). At D21, (c) body weight (n=9-10 per group) and (d) tail length (n=9-10 per group) were measured. Bars indicate the mean  $\pm$ SEM One-way analysis of variance with *post hoc* Tukey's test was performed (\*\*P<0.0001). (e) Bars indicate the mean  $\pm$ SEM of the serum FITC concentration (assessed 3 h post *per os* administration; n=7-10 per group). Mann-Whitney test was performed (\*p=0.0418). (f) Bars indicate the concentration of fecal calprotectin in mice at D21

(n=7-10 per group). Unpaired t-test (\*p=0.0106) or Mann-Whitney (\*\*p=0.0012) test was performed. SD, Standard diet; SD INDO 1 Standard Diet + indomethacin gavages (1mg/kg); SD INDO 2.5 Standard Diet + indomethacin gavages (2.5mg/kg); LP, Low protein diet; LP INDO 1 LP + indomethacin gavages (1mg/kg); LP INDO 2.5 LP + indomethacin gavages (2.5mg/kg).

**Figure 5: Cytokine and tight junction proteins RNA expression assessment in C57BL/6 mice fed a low protein or isocaloric standard diet combined with chronic indomethacin gavages** Jejunal tight junction protein mRNA relative expression as (a) Claudin-2 (t-test \* p=0.0336) and (b) occludin (t-test \*\*p<0.01; \*p=0.0171) were measured. Proinflammatory cytokines mRNA levels in the jejunum as (c) MCP-1 (t-test \*p<0.05) and (d) TNF- $\alpha$  mRNA relative expression were performed. Bars indicate the mean  $\pm$ SEM Unpaired t-test or Mann-Whitney test was performed. SD, Standard diet; SD INDO 1 Standard Diet + indomethacin gavages (1mg/kg); SD INDO 2.5 Standard Diet + indomethacin gavages (2.5mg/kg); LP, Low protein diet; LP INDO 1 LP + indomethacin gavages (1mg/kg); LP INDO 2.5 LP + indomethacin gavages (2.5mg/kg).

**Figure 6: Villi length, crypt depth and muscularis thickness in C57BL/6 mice fed a low protein or isocaloric standard diet combined with chronic indomethacin gavages.**(a) Jujunal section stained with HES solution were used to assess Intestinal damages. (b) Villi length (t test \*P= 0.0186 vs SD), (c) crypt depth (Mann-Whitney \$ P= 0.0714 vs SD) and (d) *muscularis* thickness (t test \*P= 0.0254 vs SD - Mann-Whitney \*\*P= 0.0283 vs SD) were measured. Unpaired t-test or Mann-Whitney test was performed SD, Standard diet; SD INDO 1 Standard Diet + indomethacin gavages (1mg/kg); SD INDO 2.5 Standard Diet + indomethacin gavages (2.5mg/kg); LP, Low protein diet; LP INDO 1 LP + indomethacin gavages (1mg/kg); LP INDO 2.5 LP + indomethacin gavages (2.5mg/kg).

**Figure 7: Graphical abstract**

Undernutrition leads to growth failure and is often associated to environmental enteric dysfunction (EED). We aimed to develop a preclinical model of undernourished model with environmental enteropathy features such high intestinal inflammation and intestinal permeability. To induce undernutrition with EED, post-weaning C57BL/6 mice were fed with malnourished diet alone or combined with a gastrointestinal insult trigger. Growth was assessed by body weight and tail length. Intestinal permeability and inflammation were used as enteropathic markers. CR and LP for 3 weeks induced stunting and wasting but had no intestinal impact. We therefore decided to combine LP diet to a gastrointestinal insult trigger by liposaccharides (LPS) or indomethacin. LPS did not significantly impact small intestine while indomethacin increased fecal calprotectin production. To accentuate the effects, we investigated the effects of repeated gavages of indomethacin in addition to LP diet and mice exhibited stunting and wasting with intestinal hyperpermeability and gut inflammation.



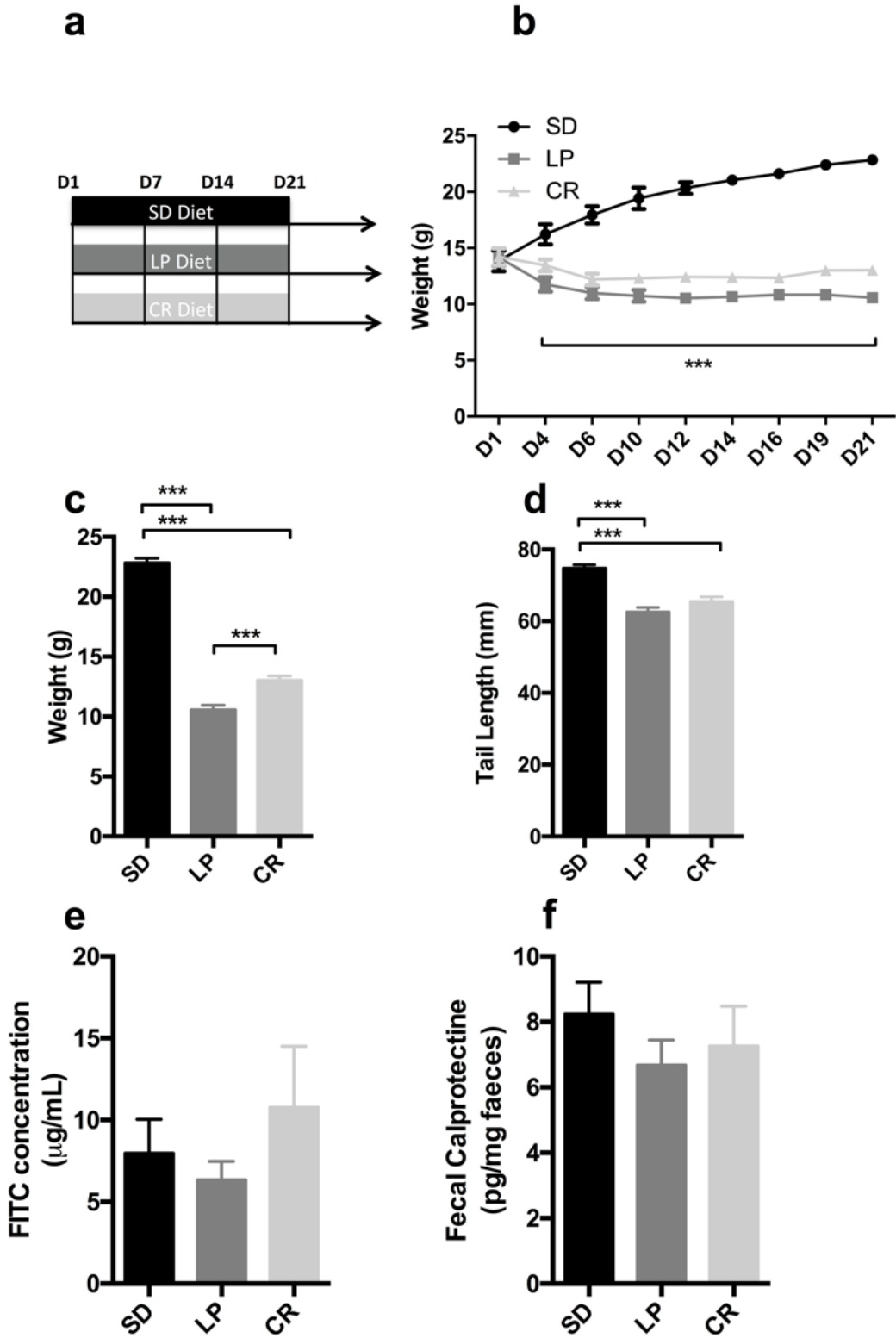


Figure 1

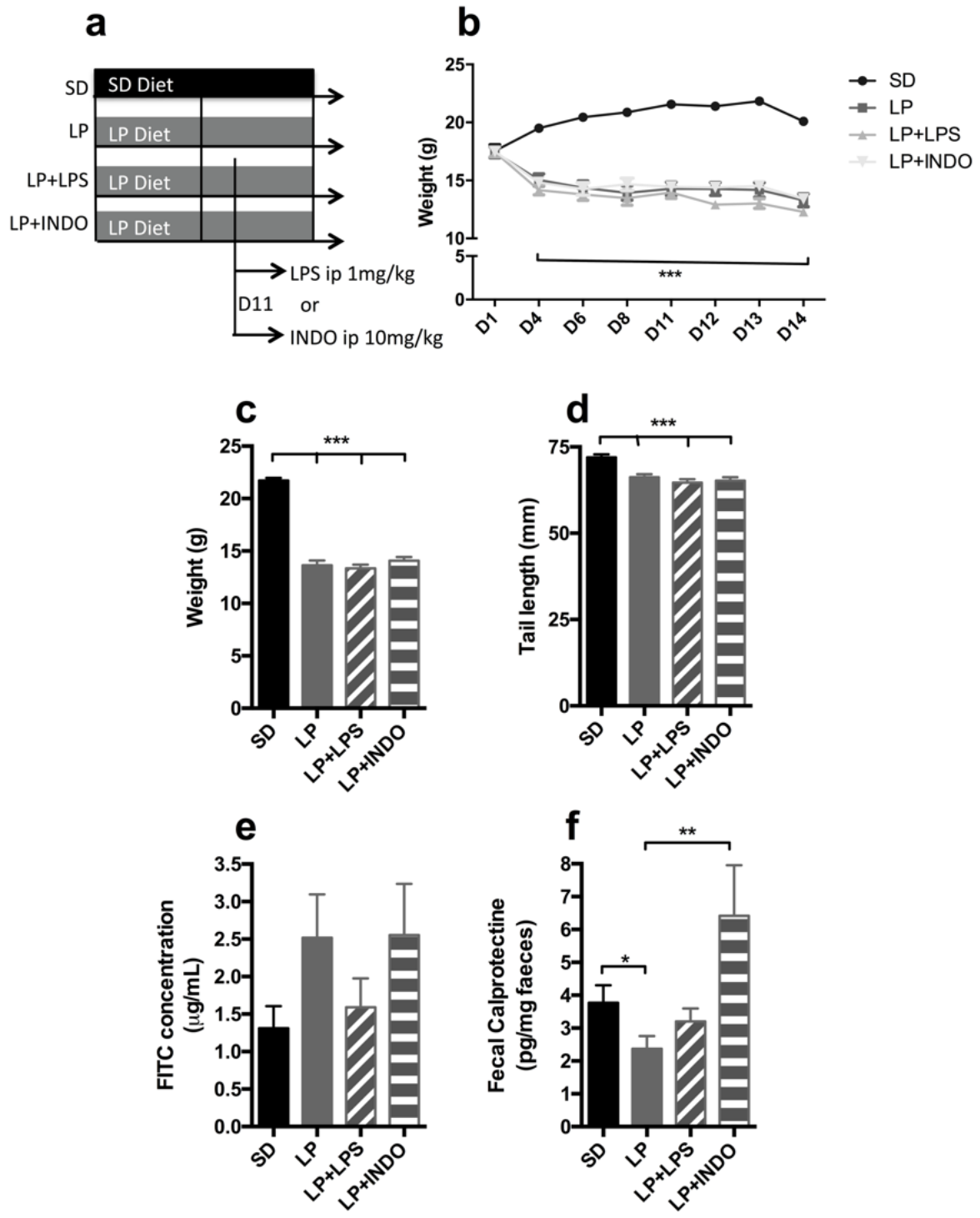


Figure 2

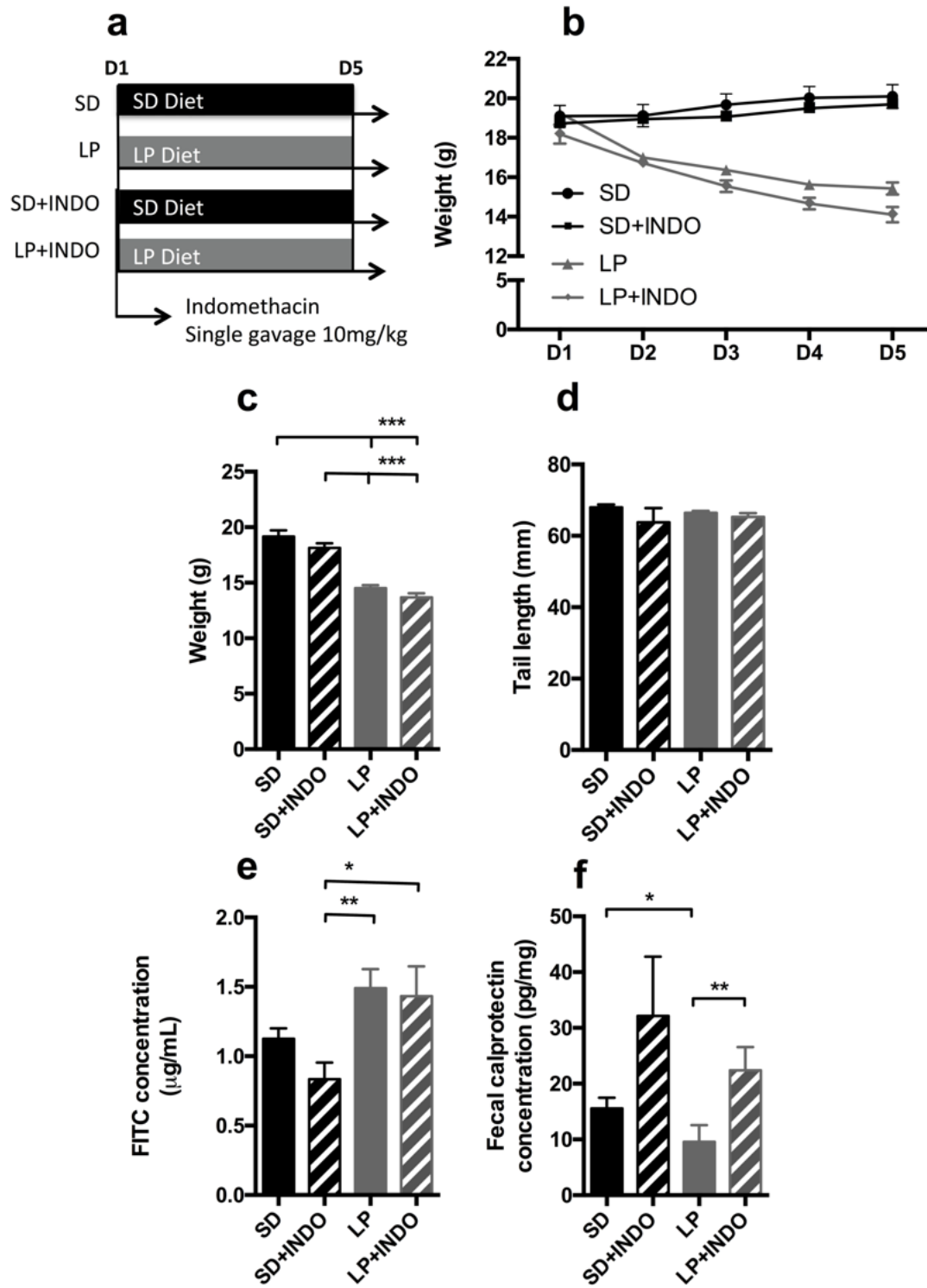


Figure 3

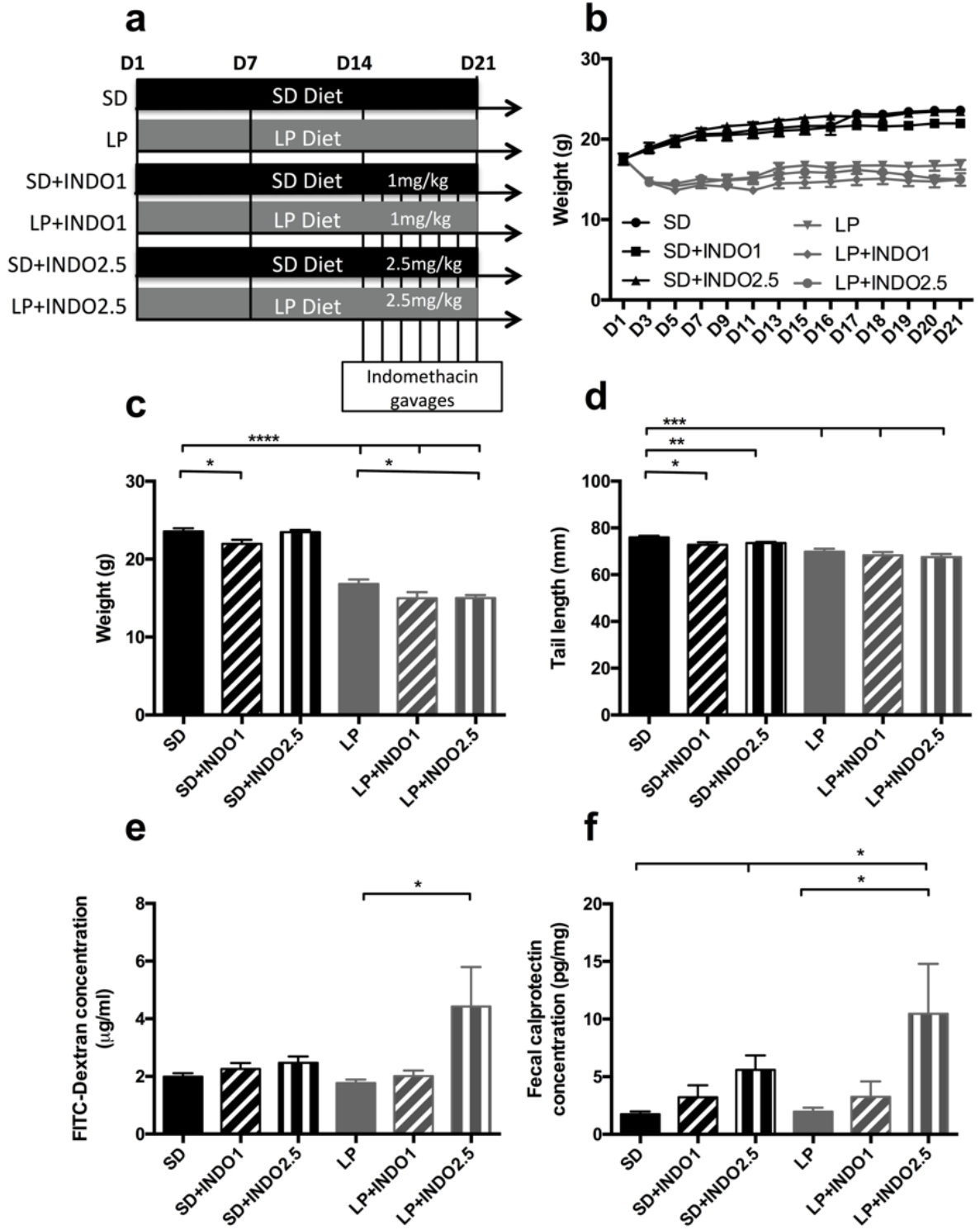


Figure 4

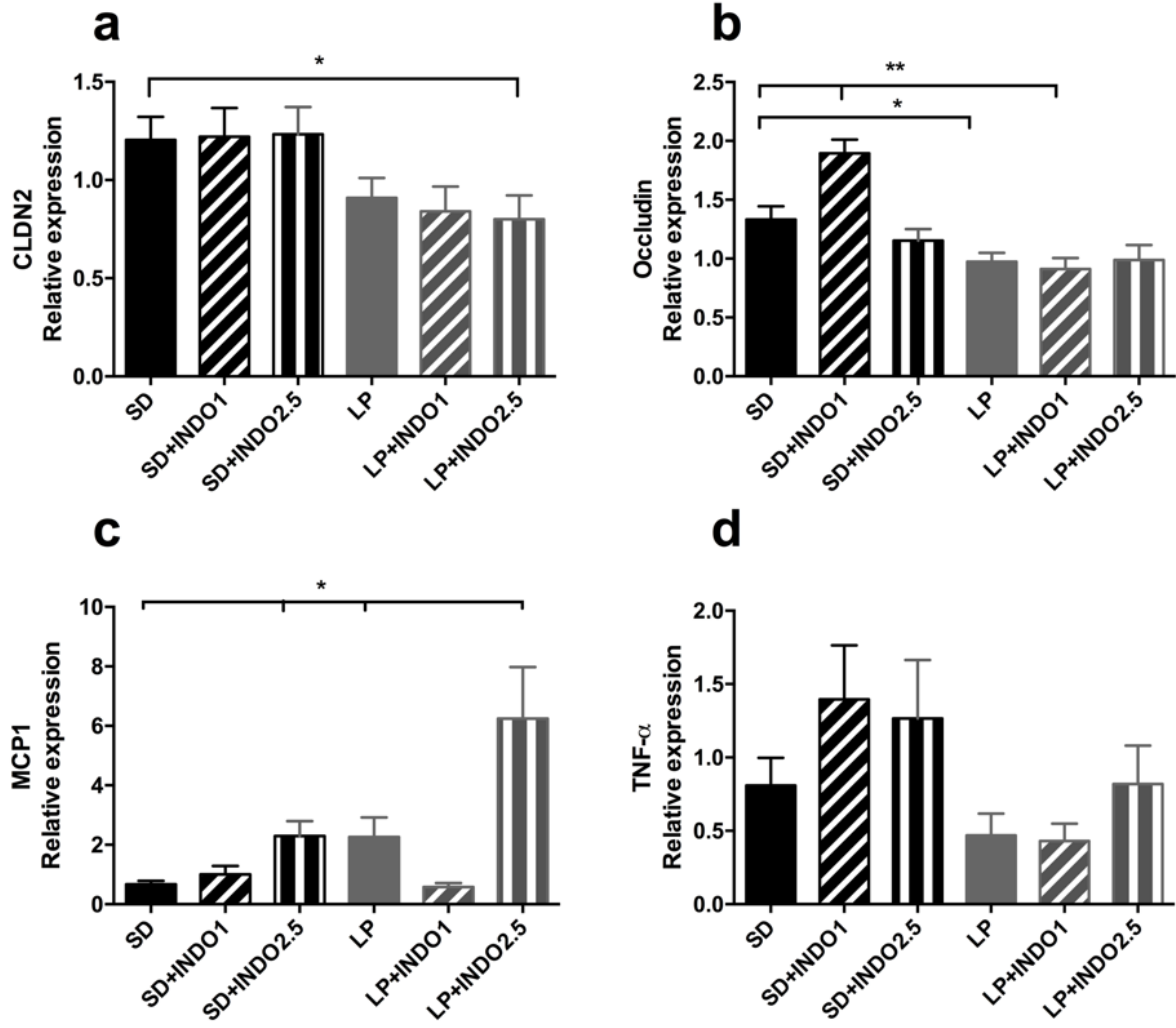


Figure 5

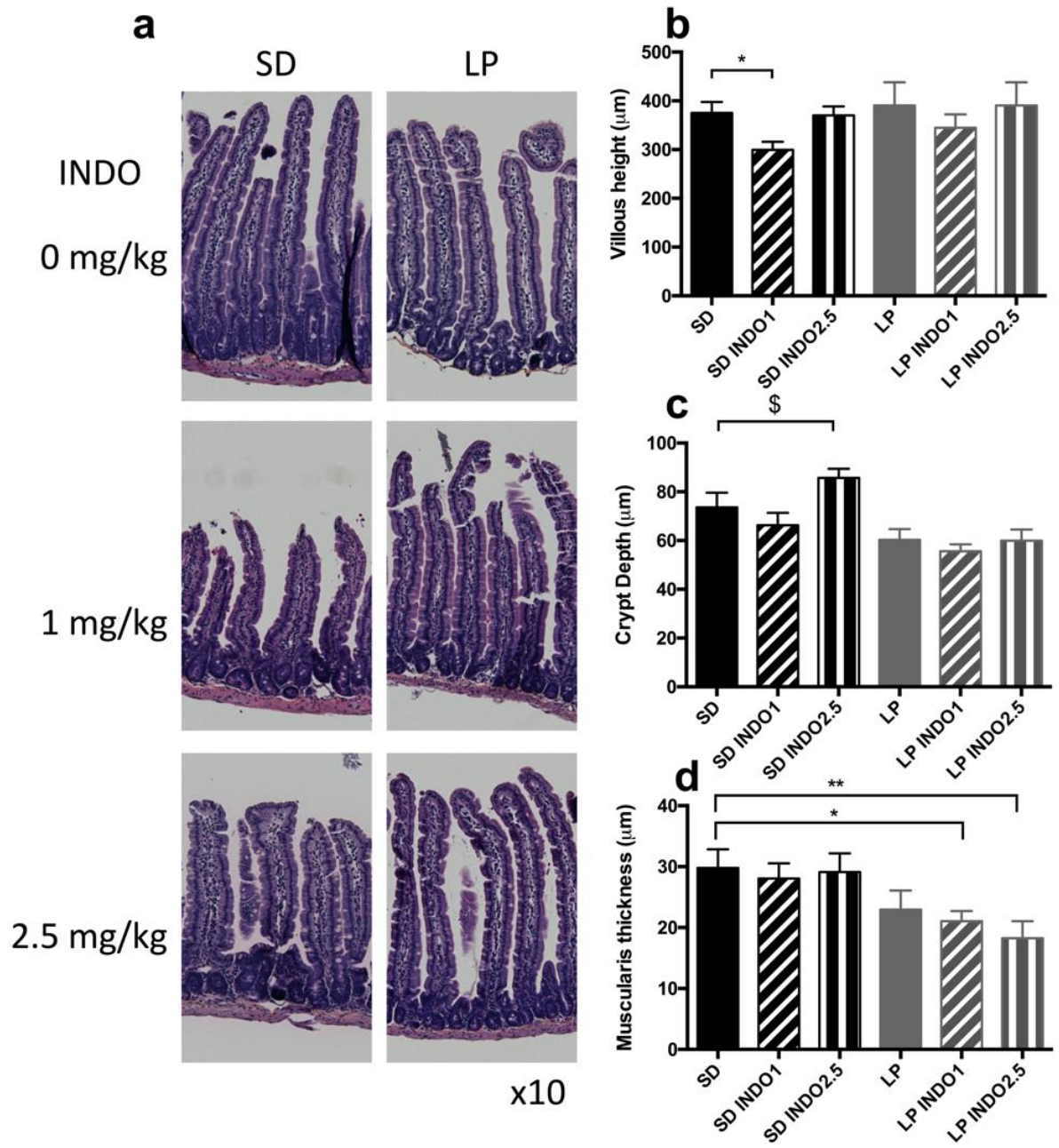


Figure 6





			Caloric Restriction	Low Protein Diet	Low Protein Diet + LPS	Low Protein Diet +Acute INDO	Low Protein Diet +Chronic INDO
Growth	Weight loss		✓	✓	✓	✓	✓
	Linear Growth		✓	✓	✓	✓	✓
Barrier function	Inflammation Calprotectin					✓	✓
	Leaky gut						✓

Figure 7

## Article n°2

### **Évaluation de la supplémentation du lait thérapeutique F-75 en glutamine et en leucine sur la croissance et la fonction de barrière intestinale dans un modèle murin de dénutrition sévère avec entéropathie.**

**Contexte** Un lait thérapeutique F-75 est utilisé lors de la phase de stabilisation de la MAS. Sa composition n'a pratiquement pas été modifiée depuis 2 décennies. Dans cette étude, le lait thérapeutique a été supplémenté en glutamine, connue pour ses effets améliorant la fonction de barrière intestinale, et en leucine, promotrice de la synthèse protéique.

**Objectifs** L'objectif a été d'évaluer la supplémentation du lait thérapeutique F-75 en glutamine et en leucine sur notre modèle préclinique.

**Méthodes** Des souris C57BL/6 âgées de 3 semaines ont été utilisées et nourries avec un régime pauvre en protéines (5,8%) durant 3 semaines afin d'induire une dénutrition protéique. De J14 à J21, l'entéropathie a été induite par un gavage quotidien d'indométacine (2,5mg/kg de poids de souris) alors que les souris contrôles ont reçu le diluant. Pendant cette période, l'alimentation sous forme de croquettes a été remplacée par un lait thérapeutique F-75 supplémenté soit (i) en glutamine (4%) et leucine (1%), soit (ii) en un cocktail d'acides aminés (5% - solution isoazotée) ou soit (iii) en maltodextrine (5% - solution isocalorique). Le poids et la croissance linéaire ont été évalués ainsi que la fonction de barrière intestinale (perméabilité intestinale, calprotectine fécale, expression en ARNm codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et MCP-1, et ARNm codant pour des protéines de jonctions serrées comme claudine-2, occludine et zonula-Occludens 1).

**Résultats** Le modèle de dénutrition avec entéropathie présente un retard de croissance staturo-pondéral caractérisée par une perte de poids ( $p < 0,0001$ ) et une diminution de la taille de la queue ( $p = 0,0007$ ). La dénutrition combinée aux gavages d'indométacine induit une production plus accrue de calprotectine fécale ( $p = 0,0432$ ), avec une diminution de l'expression en ARNm codant pour TNF- $\alpha$  ( $p = 0,0469$ ). La perméabilité intestinale reste inchangée dans ce modèle avec une diminution de l'expression en ARNm codant pour claudine-2 uniquement ( $p = 0,0007$ ). La supplémentation du lait en maltodextrine freine la perte de poids ( $p < 0,05$ ) sans impacter la longueur de la queue, la production de calprotectine fécale ou la perméabilité intestinale. L'expression jéjunale en ARNm codant pour MCP-1, occludine et ZO-1 est inchangée quelque soit la supplémentation. En revanche, la supplémentation en glutamine et en leucine augmente significativement l'expression jéjunale en



ARNm codant pour TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) et claudine-2 ( $p < 0,05$ ). Le cocktail d'acides aminés améliore la croissance linéaire des souris par rapport à la supplémentation en maltodextrine dans le lait ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion** Pour conclure, le modèle murin présente une dénutrition caractérisée par un retard de croissance staturo-pondéral et une entéropathie. Les laits thérapeutiques supplémentés en glutamine/leucine, en acides aminés ou en maltodextrine améliorent la prise de poids avec un effet additionnel du cocktail d'acides aminés sur la croissance linéaire. La supplémentation en glutamine et leucine induit une augmentation de l'expression jéjunale en ARNm codant pour TNF- $\alpha$  et claudine-2. Par contre, des études complémentaires sont nécessaires afin d'optimiser la composition en protéines du lait thérapeutique et ainsi améliorer significativement la modulation de la fonction de barrière intestinale par ces acides aminés spécifiques.

**Growth parameters and gut barrier function in undernourished mice with enteropathy: impact of refeeding with amino acids enriched therapeutic milk.**

**Authors :** Emmeline SALAMEH, Marine Jarbeau, Fanny B. Morel, Mamane Zeilani, Zoé Racine, Pierre Déchelotte, Rachel Marion-Letellier

**Affiliations**

Normandie Univ, INSERM Unit 1073, University of Rouen, France. (ES, MJ, ZR, RML)

Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen, France. (ES, MJ, PD, RML)

Nutriset S.A.S, Nutrition Department, Malaunay, France. (ES, FM, MZ)

Rouen University Hospital, Nutrition unit, Rouen, France. (PD)

**Mail addresses**

[Emmeline.salameh@etu.univ-rouen.fr](mailto:Emmeline.salameh@etu.univ-rouen.fr)

[Marine.jarbeau@univ-rouen.fr](mailto:Marine.jarbeau@univ-rouen.fr)

[Fmorel@nutriset.fr](mailto:Fmorel@nutriset.fr)

[Mzeilani@nutriset.fr](mailto:Mzeilani@nutriset.fr)

[Zoe.racine@etu.univ-rouen.fr](mailto:Zoe.racine@etu.univ-rouen.fr)

[Pierre.dechelotte@chu-rouen.fr](mailto:Pierre.dechelotte@chu-rouen.fr)

[Rachel.letellier@univ-rouen.fr](mailto:Rachel.letellier@univ-rouen.fr)

**Corresponding author:** Dr Rachel Marion-Letellier (<https://orcid.org/0000-0002-3006-5943>)

**Telephone number: +33 235148242 email address: rachel.letellier@univ-rouen.fr**

**Conflics of interest**

F. Morel and M. Zeilani work for Nutriset, a private company manufacturing therapeutic milk F-75 and which provided financial support to the study.

Other authors do not declare any conflict of interest related to this study

**Abstract (80 words)**

Undernutrition, a global health issue, leads to stunting and/or wasting in children and associated enteropathy hampers appropriate refeeding. We investigated whether enrichment of therapeutic milk (TM) with amino acids (AA) improved outcome in undernourished mice with enteropathy (UE). UE mice displayed weight loss, increased fecal calprotectin concentration and decreased jejunal TNF- $\alpha$  mRNA levels. Standard TM reduced weight loss. Non-essential AA-enriched TM improved growth, while glutamine-leucine-enriched TM restored TNF- $\alpha$  and claudin-2 mRNA levels. AA enrichment of TM should be considered.

**Keywords:** enteropathy, glutamine, gut barrier, leucine, therapeutic milk, undernutrition.

## Introduction

Severe acute malnutrition (SAM) is a major global health concern affecting 17 millions of children aged under 5 years old (Unicef et al. 2018) leading to a high morbidity and mortality. SAM is often associated with environmental enteropathy (EE) characterized by intestinal hyperpermeability, gut inflammation and villus blunting (Budge et al. 2019). EE may contribute to SAM treatment failure (Attia et al. 2016). Therapeutic milk (TM) of the F75 type (75 Kcal/100ml) is recommended during stabilization phase of complicated SAM (Ashworth et al. 2004), which may last between 1 to 7 days (Burza et al. 2015).

To improve SAM outcome, we aimed to improve gut barrier dysfunction by adding two amino acids that are known to promote animal growth (Sun et al. 2015; Zhu et al. 2018), glutamine (GLN) and leucine (LEU), to a standard therapeutic milk formula. Beneficial effects of GLN supplementation on intestinal inflammation and gut barrier function have previously been demonstrated (Mbodji et al. 2011; Hou et al. 2013; Bertrand et al. 2015). GLN is an important fuel for enterocytes and immune cells (Yi et al. 2015). Moreover, GLN has been reported to promote survival (Liu et al. 2017). Curi et al. (2005) have also shown its positive impact on intestinal ion absorption by the gut (Curi et al. 2005). LEU is of interest for addition to low-protein diets due to its ability to regulate protein synthesis (Rhoads and Wu 2009) and to promote animal growth (Zhang et al. 2013). In addition, LEU increases the secretion of growth hormones (Gao et al. 2015), stimulates protein synthesis process in particular in neonates (Columbus et al. 2015) and inhibits protein degradation in skeletal muscle (Dardevet et al. 2002; Hernandez-García et al. 2016).

The aim of this study was thus to investigate whether F-75 enriched with GLN and LEU improved growth and gut barrier function in a murine model of undernutrition with enteropathy (UE) in comparison to standard TM and to mixed isonitrogenous non-essential AA enriched TM.

## **Material and Methods**

**Ethics** Animal care and experimentation complied with both French and European community regulations (Official Journal of the European Community L 358, 18/12/1986) and local ethic comity CENOMEXA (APAFIS#6185).

**Undernutrition-enteropathy (UE) induction:** Post-weaning three-week-old male mice C57BL/6 (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) received standard (CT - A03 21.4% protein, 5.1% fat - SAFE, Augy, France) or low protein diet (LP, 5.8% protein, 6% fat, n=20 – SAFE) for 21 days. Enteropathy was induced by daily gavage of indomethacin, (UE - 2.5 mg/kg, n=12 per group) diluted in Dimethyl Sulfoxide (Whitfield-Cargile et al. 2016) for 7 days from D14 to D21. Tail length was measured at D21 to assess linear growth (Fig.1a).

### **Therapeutic milk supplementation**

Mice were separated in 3 groups and received i) standard F75 therapeutic milk (TM -Nutrisset SAS, Malaunay, France) TM enriched with 4% of glutamine and 1% of leucine (GLN-LEU-TM) or a isonitrogenous TM supplemented with 5% amino acids (Gly/Ala/Ser/Pro/Asp/Asn/His : 2/2/4/4/7/10/10,-AA-TM) (Coëffier et al. 2003) or an isocaloric TM supplemented with 5% maltodextrin (TM) (Fig.1a). TM was reconstituted according to manufacturer's instructions and 0.12% of Thixogum® (Nexira, Rouen, France) was added to avoid sedimentation. TM was proposed ad libitum in water bottles and totally replaced diet and water.

**Fecal calprotectin:** Fecal calprotectin was measured by ELISA (S100A8/S100A) according to manufacturer's instructions (R&D System, Mineapolis, USA).

**Intestinal permeability assessment** Intestinal permeability was assessed by serum FITC-dextran concentration after FITC-dextran gavage as previously described (Ghouzali et al. 2016).

**mRNA levels for cytokine** (MCP-1, TNF $\alpha$ ) **and tight junction proteins** (Claudin-2, Occludin, Zonula-occludens1) were analyzed by RT-qPCR as previously described (Charpentier et al. 2018). GAPDH, 18S and  $\beta$ -2-microglobulin were used as reference genes.

**Statistics** Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and were compared using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, United States). Inter-individual comparisons between two groups were performed with parametric Student t test or non-parametric Mann-Whitney test. ANOVA followed by Tukey post-tests (parametric) or Kruskal-Wallis followed by Dunn's posttests (non-parametric) were used for more than two groups. P value<0.05 was considered significant.

## Results

### Effect of UE on growth and gut barrier function.

UE induced significant weight loss compared to the control group (Fig.1b -  $p < 0.0001$ ) and reduced growth assessed by decreased tail length (Fig.1c -  $p = 0.0007$ ). UE also induced higher fecal calprotectin concentration (Fig.1e) and lower jejunal TNF- $\alpha$  mRNA levels compared to the control group (Table1 -  $p = 0.0432$ ,  $p = 0.0469$  respectively). Global intestinal permeability did not differ among groups (Fig.1d). UE model did not modify mRNA levels for jejunal tight junction protein occludin and ZO-1 while it significantly decreased claudin-2 mRNA levels (Table1 -  $p = 0.0007$ ).

### Effect of Therapeutic Milk

TM reduced UE-induced weight loss (Fig.1b  $p < 0.05$ ) while it did not restore tail length (Fig.1c), fecal calprotectin (Fig.1e) or intestinal permeability (Fig.1d). Jejunal MCP-1, occludin and ZO-1 mRNA expression did not differ among groups (Table1). TM significantly increased claudin-2 mRNA expression (Table 1,  $p = 0.0022$ ). AA-TM improved growth significantly (Fig.1B  $P < 0,05$  vs UE-TM). GLN-LEU-TM induced higher mRNA expression of TNF- $\alpha$  and claudin-2 compared to UE mice (Table 1 -  $p < 0.05$ ).



## Discussion

In the present study, combining a low protein diet with indomethacin treatment resulted in an experimental model of undernutrition with enteropathy (UE), characterized by severe weight loss, impaired growth and intestinal inflammation. This is in accordance with previous studies investigating the effect of protein-deficient diets on growth (Brown et al. 2015; Sampaio et al. 2016). We also found an impact on gut barrier function with an increased level of fecal calprotectin. Higher fecal calprotectin levels have been observed in hospitalized children in Malawi with complicated SAM (Attia et al. 2016). UE mice exhibited lower TNF $\alpha$  mRNA jejunal levels, which is in accordance with reduced TNF $\alpha$  production in the small intestinal lamina propria of undernourished mice (Maldonado Galdeano et al. 2011). Jejunal MCP-1 mRNA levels also tended to decrease in the UE mice as previously described in mice fed with low-protein diet (Brown et al. 2015). An altered immune response has also been described in SAM children (Scrimshaw 2003; Black et al. 2013).

Refeeding with standard TM increased body weight in UE mice, as previously described in undernourished mice using a probiotic-fermented milk (Maldonado Galdeano et al. 2011). However standard TM had no impact on tail length, an indicator of growth. Short duration of TM administration in mice was in accordance with the clinical situation. Indeed, according to current practice, the use of therapeutic milk F-75 lasts 3-7 days and is not intended to promote growth but merely to cover basal metabolic needs (Burza et al. 2015). This may be inadequate however, since repeated episodes of growth interruption with recurrent enteropathy may lead to long-lasting stunting. The mixed amino acids supplementation had no additional effect on body weight gain while it increased linear growth as demonstrated by higher tail length. Amino acids are crucial for growth; however therapeutic milk is purposely limited in its protein content because it is only used for stabilization phase and concerns have been raised about the risk of hypophosphatemia if adequate electrolyte and micronutrients supplementation is not provided. As a matter of fact, during this phase, widely used protocols recommend 135 mL of TM per kg per day during the phase I (Burza et al. 2015) thus providing approximately 1.3 g of protein per kg per day while the protein needs are estimated to be as high as 2.72 g/kg/day for children during catch-up growth (Manary et al. 2016). Thus, increasing protein intake may be critical to support growth. As expected, according to our hypothesis, AA-TM improved growth impairment in the present study, which suggests that addition of AA to a standard TM providing 1.3 g/kg/day may help to

approach protein requirements in SAM children, at a specific time during the inpatient treatment when medical complications are most likely to occur.

While numerous studies demonstrated beneficial effects of glutamine or other amino acids on gut barrier function (Belmonte et al. 2007; Rhoads and Wu 2009; Mbodji et al. 2011; Bertrand et al. 2015), we did not observe in this study a significant impact of AA enrichment of TM on intestinal permeability, fecal calprotectin or mRNA levels for tight junction proteins except for claudin-2. We speculate that the low amount of protein in the TM may contribute to this lack of effect. Indeed, the amount of dietary protein influenced mucosal healing and gut barrier response in colitis models (Vidal-Lletjós et al. 2019): mice receiving a 14% of protein diet were more vulnerable to colitis induction than mice fed with a 30% protein diet (Vidal-Lletjós et al. 2019). In the absence of sufficient protein and energy intake, supplemental AA may be readily oxidized for energy provision, preventing the development of their signaling effects on repair processes (Curi et al. 2005).

UE mice displayed a lower expression of jejunal mRNA levels for claudin-2 while therapeutic milk re-nutrition with or without added glutamine and leucine restored it. Undernutrition models are often associated with claudin-2 upregulation. Three-weeks of low protein diet induced a higher jejunal mRNA levels of claudin-2 in mice (Brown et al. 2015). These discrepancies between models may result from indomethacin exposure, since claudin-2 suppression by indomethacin in intestinal T84 cells has been reported (Mima et al. 2008). Of note, claudin-2 and TNF $\alpha$  mRNA levels followed a similar pattern in the present study, which could be related to the fact that claudin-2 expression is regulated by TNF $\alpha$  as previously described in HT26/B6 cells (Mankertz et al. 2009).

Refeeding with TM increased mRNA levels of pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$  without reaching statistical significance, as previously described in undernourished mice re-fed with probiotic-fermented milk (Maldonado Galdeano et al. 2011). Refeeding with GLN-LEU-TM increased mRNA levels of TNF $\alpha$ ; supplementation of non-malnourished mice fed with 1% of L-glutamine for 2 weeks also increased the expression of mRNA levels of TNF $\alpha$  in the ileum but not in the jejunum (Ren et al. 2014).

**Conclusion** In this model of severe malnutrition with enteropathy, enrichment of TM with AA, stimulated growth, in addition to reducing weight loss. Additional glutamine and leucine may bring some distinct effects

on immune and barrier function. However, further studies are needed to optimize the level of protein intake and achieve more significant modulating effects of specific amino acids on barrier function.

### **Acknowledgments**

This study was supported by Nutriset SAS and the National Association of Research and Technology (ANRT) within the framework of a CIFRE convention, and the Charles Nicole Foundation.

## References

- Ashworth A, Chopra M, McCoy D, et al (2004) WHO guidelines for management of severe malnutrition in rural South African hospitals: effect on case fatality and the influence of operational factors. *The Lancet* 363:1110–1115. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15894-7
- Attia S, Versloot CJ, Voskuil W, et al (2016) Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational cohort study. *Am J Clin Nutr* 104:1441–1449. doi: 10.3945/ajcn.116.130518
- Belmonte L, Coëffier M, Le Pessot F, et al (2007) Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. *World J Gastroenterol* 13:2833–2840
- Bertrand J, Marion-Letellier R, Azhar S, et al (2015) Glutamine enema regulates colonic ubiquitinated proteins but not proteasome activities during TNBS-induced colitis leading to increased mitochondrial activity. *Proteomics* 15:2198–2210. doi: 10.1002/pmic.201400304
- Black RE, Victora CG, Walker SP, et al (2013) Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *The Lancet* 382:427–451. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60937-X
- Brown EM, Wlodarska M, Willing BP, et al (2015) Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. *Nature Communications* 6:7806. doi: 10.1038/ncomms8806
- Budge S, Parker AH, Hutchings PT, Garbutt C (2019) Environmental enteric dysfunction and child stunting. *Nutr Rev* 77:240–253. doi: 10.1093/nutrit/nuy068
- Burza S, Mahajan R, Marino E, et al (2015) Community-based management of severe acute malnutrition in India: new evidence from Bihar. *Am J Clin Nutr* 101:847–859. doi: 10.3945/ajcn.114.093294
- Charpentier C, Chan R, Salameh E, et al (2018) Dietary n-3 PUFA May Attenuate Experimental Colitis. *Mediators Inflamm* 2018:8430614. doi: 10.1155/2018/8430614

Coëffier M, Claeysens S, Hecketsweiler B, et al (2003) Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 285:G266–G273. doi: 10.1152/ajpgi.00385.2002

Columbus DA, Fiorotto ML, Davis TA (2015) Leucine is a major regulator of muscle protein synthesis in neonates. *Amino Acids* 47:259–270. doi: 10.1007/s00726-014-1866-0

Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, et al (2005) Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* 204:392–401. doi: 10.1002/jcp.20339

Dardevet D, Sornet C, Bayle G, et al (2002) Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *J Nutr* 132:95–100. doi: 10.1093/jn/132.1.95

Gao X, Tian F, Wang X, et al (2015) Leucine Supplementation Improves Acquired Growth Hormone Resistance in Rats with Protein-Energy Malnutrition. *Plos One* 10:e0125023. doi: 10.1371/journal.pone.0125023

Ghouzali I, Lemaitre C, Bahlouli W, et al (2016) Targeting immunoproteasome and glutamine supplementation prevent intestinal hyperpermeability. *Biochimica et biophysica acta*. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.08.010

Hernandez-García AD, Columbus DA, Manjarín R, et al (2016) Leucine supplementation stimulates protein synthesis and reduces degradation signal activation in muscle of newborn pigs during acute endotoxemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 311:E791–E801. doi: 10.1152/ajpendo.00217.2016

Hou Y-C, Chu C-C, Ko T-L, et al (2013) Effects of alanyl-glutamine dipeptide on the expression of colon-inflammatory mediators during the recovery phase of colitis induced by dextran sulfate sodium. *Eur J Nutr* 52:1089–1098. doi: 10.1007/s00394-012-0416-3

Liu G, Ren W, Fang J, et al (2017) L-Glutamine and L-arginine protect against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection via intestinal innate immunity in mice. *Amino Acids* 49:1945–1954. doi: 10.1007/s00726-017-2410-9

Maldonado Galdeano C, Novotny Núñez I, de Moreno de LeBlanc A, et al (2011) Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-

malnutrition model in mice. *BMC gastroenterology* 11:64. doi: 10.1186/1471-230X-11-64

Manary M, Callaghan M, Singh L, Briend A (2016) Protein Quality and Growth in Malnourished Children. *Food Nutr Bull* 37 Suppl 1:S29-36. doi: 10.1177/0379572116629023

Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, et al (2009) TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res* 336:67–77. doi: 10.1007/s00441-009-0751-8

Mbodji K, Torre S, Haas V, et al (2011) Alanyl-glutamine restores maternal deprivation-induced TLR4 levels in a rat neonatal model. *Clinical Nutrition* 30:672–677. doi: 10.1016/j.clnu.2011.04.002

Mima S, Takehara M, Takada H, et al (2008) NSAIDs suppress the expression of claudin-2 to promote invasion activity of cancer cells. *Carcinogenesis* 29:1994–2000. doi: 10.1093/carcin/bgn134

Ren W, Duan J, Yin J, Liu G (2014) Dietary l - glutamine supplementation modulates microbial community and activates innate immunity in the mouse intestine. *Amino Acids* 2403–2413. doi: 10.1007/s00726-014-1793-0

Rhoads JM, Wu G (2009) Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids* 37:111–122. doi: 10.1007/s00726-008-0225-4

Sampaio IC, Medeiros PHQS, Rodrigues F a. P, et al (2016) Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. *Braz J Med Biol Res* 49:e5340. doi: 10.1590/1414-431X20165340

Scrimshaw NS (2003) Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. *J Nutr* 133:316S-321S. doi: 10.1093/jn/133.1.316S

Sun Y, Wu Z, Li W, et al (2015) Dietary L-leucine supplementation enhances intestinal development in suckling piglets. *Amino Acids* 47:1517–1525. doi: 10.1007/s00726-015-1985-2

Unicef UNCF, (who) WHO, wbJ WB (2018) Levels and Trends in Child Malnutrition. eSocialSciences

Vidal-Lletjós S, Andriamihaja M, Blais A, et al (2019) Dietary Protein Intake Level Modulates Mucosal Healing and Mucosa-Adherent Microbiota in Mouse Model of Colitis. *Nutrients* 11:514. doi: 10.3390/nu11030514

Whitfield-Cargile CM, Cohen ND, Chapkin RS, et al (2016) The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes* 7:246–261. doi: 10.1080/19490976.2016.1156827

Yi D, Hou Y, Wang L, et al (2015) L-Glutamine enhances enterocyte growth via activation of the mTOR signaling pathway independently of AMPK. *Amino Acids* 47:65–78. doi: 10.1007/s00726-014-1842-8

Zhang S, Qiao S, Ren M, et al (2013) Supplementation with branched-chain amino acids to a low-protein diet regulates intestinal expression of amino acid and peptide transporters in weanling pigs. *Amino Acids* 45:1191–1205. doi: 10.1007/s00726-013-1577-y

Zhu Y, Li T, Huang S, et al (2018) Maternal L-glutamine supplementation during late gestation alleviates intrauterine growth restriction-induced intestinal dysfunction in piglets. *Amino Acids* 50:1289–1299. doi: 10.1007/s00726-018-2608-5

**Figure legend and table**

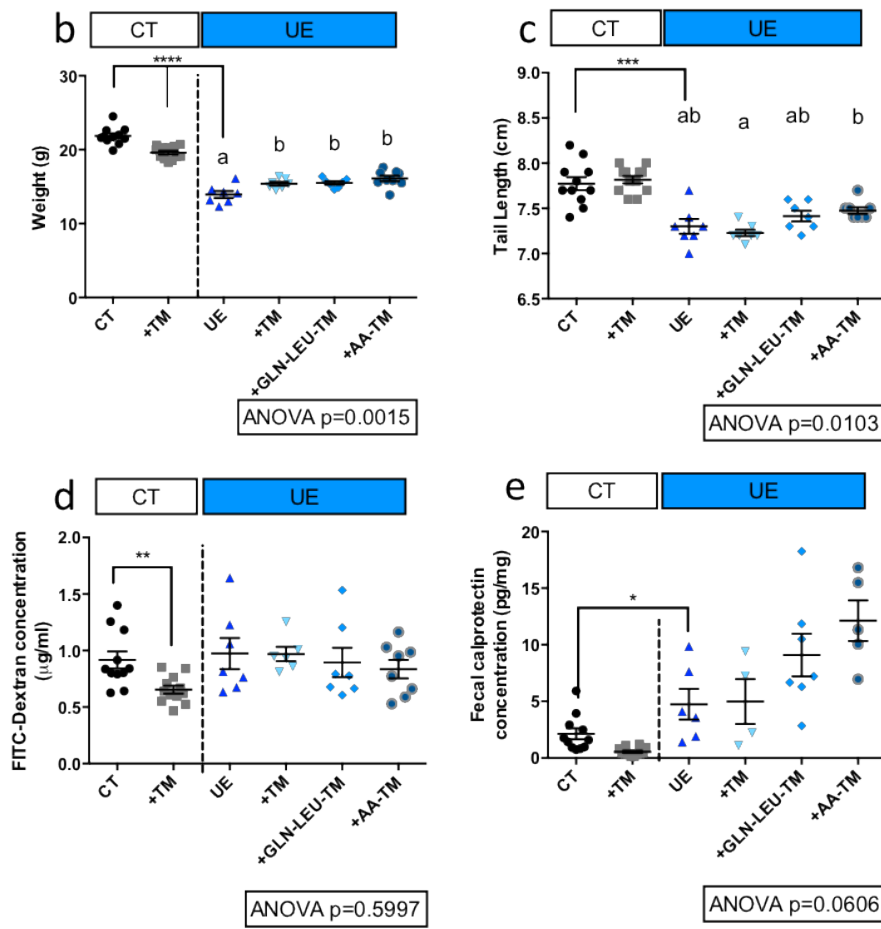
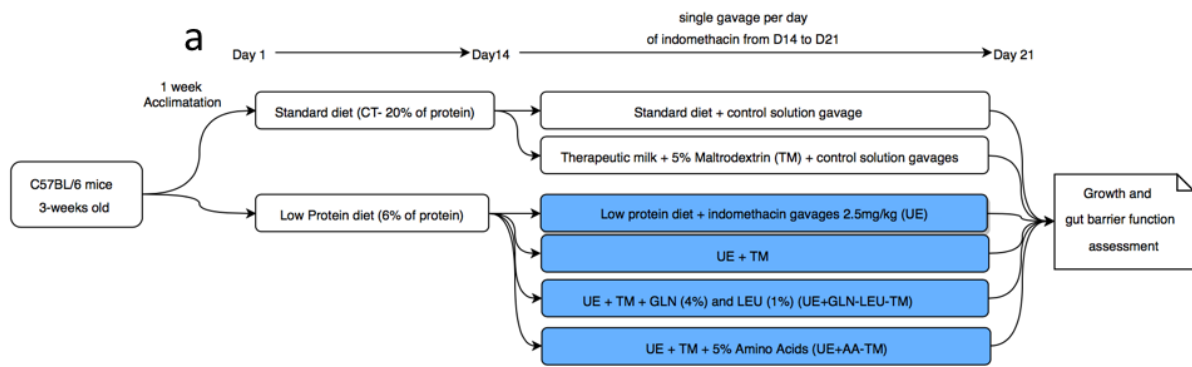
**Figure 1:** Growth, intestinal inflammation and permeability in a model of undernutrition with enteropathy and evaluation of supplemented Therapeutic Milk on these parameters. A) experimental design, B) body weight, C) tail length, D) global intestinal permeability & E) fecal calprotectin production. \*p=0.04, \*\*p=0.004, \*\*\*p=0.0007, \*\*\*\*p<0.0001. Standard diet CT, Undernutrition & enteropathy UE.

**Table 1:** mRNA levels for jejunal tight junction proteins and cytokines.

Groups	CT	CT+TM	UE	UE+TM	UE+GLN-LEU-TM	UE+AA-TM
<b>mRNA TNF-<math>\alpha</math></b>	1.41 $\pm$ 0.5	2.14 $\pm$ 0.9	0.12 $\pm$ 0.04a*	6.5 $\pm$ 3.2ab	6.41 $\pm$ 3.6b	0.43 $\pm$ 0.1ab
<b>mRNA MCP-1</b>	1.05 $\pm$ 0.1	1.78 $\pm$ 0.4	0.94 $\pm$ 0.2	1.87 $\pm$ 0.7	1.67 $\pm$ 0.4	1.11 $\pm$ 0.3
<b>mRNA occludin</b>	2.24 $\pm$ 0.2	2.32 $\pm$ 0.2	2.24 $\pm$ 0.3	1.47 $\pm$ 0.4	1.22 $\pm$ 0.2	1.68 $\pm$ 0.4
<b>mRNA ZO-1</b>	0.87 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.1	0.74 $\pm$ 0.1	0.76 $\pm$ 0.1	0.71 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.1
<b>mRNA claudin-2</b>	1.53 $\pm$ 0.2	0.76 $\pm$ 0.2	0.58 $\pm$ 0.1***a	2.01 $\pm$ 0.4b	2.06 $\pm$ 0.2b	1.60 $\pm$ 0.3ab

Mann-Whitney test \*p=0,04 vs CT \*\*\*p=0,0007 vs CT Kruskal-Wallis a,b values without common letter are different p<0,05.





**Figure 1**

### Article n°3

## Évaluation de la supplémentation du lait thérapeutique F-75 en gomme arabique et en levures sélénées sur la croissance et la fonction de barrière intestinale dans un modèle murin de dénutrition sévère avec entéropathie.

**Contexte** La dysfonction entérique environnementale contribuerait à une mauvaise réponse aux traitements nutritionnels. Elle est caractérisée par une augmentation de la perméabilité intestinale, une inflammation intestinale et une diminution de la taille des villosités.

**Objectifs** La gomme arabique a des effets prébiotiques et proabsorbants et la levure sélénée possède des effets probiotiques induisant une diminution de l'inflammation et de la perméabilité intestinale. L'objectif a été de compléter le lait thérapeutique F-75 avec de la gomme arabique et/ou de la levure sélénée et d'évaluer leurs effets sur la fonction de barrière et l'inflammation intestinale, la dysbiose et des paramètres hypothalamiques.

**Méthodes** Des souris C57BL/6 ont été utilisées et nourries avec un régime pauvre en protéines (5,8%) durant 3 semaines afin d'induire une dénutrition protéique. De J14 à J21, l'entéropathie a été induite par un gavage quotidien d'indométacine (2,5mg/kg de poids de souris) alors que les souris contrôles ont reçu le diluant. Pendant cette période, les croquettes ont été remplacées par un lait thérapeutique F-75 supplémenté avec de la gomme arabique (10g/L) et/ou des levures sélénées (0,05mg/L). Le poids et la croissance linéaire ont été évalués ainsi que la fonction de barrière intestinale (perméabilité et inflammation), des paramètres hypothalamiques (ARNm codant pour NPY, POMC et cytokines proinflammatoires) et la composition du microbiote caecal (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* et *Lactobacillus*).

**Résultats** Le modèle murin de dénutrition avec entéropathie présente un retard de croissance pondéral ( $p < 0,0001$ ) et linéaire ( $p < 0,01$ ), une hyperperméabilité intestinale ( $p < 0,01$ ), une hypertrophie des cryptes ( $p < 0,05$ ) une inflammation intestinale (calprotectine et lipocaline-2 fécale -  $p < 0,01$  pour les deux paramètres) et hypothalamique (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$   $p < 0,05$  pour les deux paramètres), une augmentation du ratio NPY/POMC ( $p < 0,05$ ), une modification de la composition du microbiote caecal avec une augmentation du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* ( $p < 0,05$ ), une diminution de l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* ( $p < 0,05$ ) et une augmentation de l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* ( $p < 0,01$ ). Le lait thérapeutique seul induit une diminution de l'inflammation intestinale caractérisée par une diminution de la production de Lipocaline-2 ( $p < 0,01$ ).

De plus, il corrige partiellement la dysbiose caecale induite par le modèle en diminuant le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* ( $p<0,01$ ), augmente l'abondance de *Lactobacillus* ( $p<0,01$ ) et des *Bacteroidetes* ( $p<0,01$ ).

La supplémentation en gomme arabique combinée à la levure sélénée réduit drastiquement l'inflammation intestinale en diminuant la production de calprotectine ( $p<0,01$ ) et de myéloperoxydase fécale ( $p<0,05$ ) et augmente la hauteur des villosités ( $p<0,05$ ). L'enrichissement en gomme arabique et levures sélénées induit une augmentation de l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* dans le caecum ( $p<0,001$ ).

**Conclusion** Le modèle d'entéropathie et de dénutrition développe un retard de croissance staturo-pondéral, une inflammation et une hyperperméabilité intestinale. De plus, ce modèle présente une augmentation de l'inflammation hypothalamique, une augmentation du rapport NPY/POMC au niveau de l'hypothalamus et le lait permet de diminuer l'inflammation en corrigeant également partiellement la dysbiose. La gomme arabique et la levure sélénée combinées induisent une diminution plus drastique de l'inflammation intestinale et une augmentation de l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* dans le caecum.

**Gum arabic and selenium yeast-enriched therapeutic milk alleviates effects of undernutrition and enteropathy on gut barrier**

**Authors :** Emmeline SALAMEH<sup>abc</sup>, Zoé Racine<sup>ab</sup>, Marine Jarbeau<sup>ab</sup>, David Ribet<sup>ab</sup>, Fanny B. Morel<sup>c</sup>, Mamane Zeilani<sup>c</sup>, Moutaz Aziz<sup>d</sup>, Pierre Déchelotte<sup>abd</sup>, Rachel Marion-Letellier<sup>ab</sup>

**Affiliations**

<sup>a</sup>Normandie Univ, INSERM Unit 1073, University of Rouen, 76000, Rouen France.

<sup>b</sup>Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen, 76000, Rouen, France.

<sup>c</sup>Nutriset S.A.S , Nutrition Department, 76770, Malaunay, France.

<sup>d</sup>Rouen University Hospital, Anatomopathology unit, 76000, Rouen, France.

<sup>e</sup>Rouen University Hospital, Nutrition unit, Rouen, 76000, Rouen, France.

**Mail addresses:**

[Emmeline.salameh@etu.univ-rouen.fr](mailto:Emmeline.salameh@etu.univ-rouen.fr)

[Zoe.racine@etu.-univ-rouen.fr](mailto:Zoe.racine@etu.-univ-rouen.fr)

[Marine.jarbeau@univ-rouen.fr](mailto:Marine.jarbeau@univ-rouen.fr)

[David.ribet@univ-rouen.fr](mailto:David.ribet@univ-rouen.fr)

[Fmorel@nutriset.fr](mailto:Fmorel@nutriset.fr)

[Mzeilani@nutriset.fr](mailto:Mzeilani@nutriset.fr)

[Moutaz.aziz@chu-rouen.fr](mailto:Moutaz.aziz@chu-rouen.fr)

[Pierre.dechelotte@chu-rouen.fr](mailto:Pierre.dechelotte@chu-rouen.fr)

[Rachel.letellier@univ-rouen.fr](mailto:Rachel.letellier@univ-rouen.fr)

**Corresponding author:** Dr Rachel Marion-Letellier (<https://orcid.org/0000-0002-3006-5943>)

**Address:** INSERM Unit 1073, 22 Boulevard Gambetta, 76000, Rouen, France

**Telephone number:** +33 235148242 **email address:** [rachel.letellier@univ-rouen.fr](mailto:rachel.letellier@univ-rouen.fr)

## Abstract

**Background and aims:** Severe acute malnutrition (SAM) is often associated with an environmental enteropathy (EE). The early phase of nutritional treatment for SAM is based on low-protein therapeutic milk known as F-75, which is aimed at enhancing metabolic homeostasis. Surprisingly, its composition has remained quasi identical since late 1990's. We aimed to improve gut barrier function in mice presenting undernutrition and enteropathy (UE) by enriching F-75 formulation with gum arabic (GA) and/or selenium yeast (SeY).

**Methods:** Post-weaning C57BL/6 mice were fed standard or low protein diet for 21 days. To induce enteropathy, daily indomethacin (2.5 mg/kg) gavage or vehicle was performed from D14 to D21. From D14 to D21, mice were exclusively fed F-75 therapeutic milk (TM) alone or GA and or Se-Y enriched therapeutic milk while control mice and UE mice received standard or low protein diet respectively. Growth was assessed by body weight and tail length recording. Intestinal barrier function was evaluated by intestinal permeability measurement, caecal microbiota composition and inflammatory parameters. Hypothalamic mRNA levels for cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), and neuropeptides (POMC, NPY) were measured by RT-qPCR.

**Results:** UE model significantly induced (i) weight loss and linear growth retardation, (ii) intestinal hyperpermeability and (iii) higher inflammatory markers such as fecal calprotectin and lipocalin-2 production, (iv) higher hypothalamic IL-1 and TNF-  $\alpha$ , (v) higher NPY/POMC, (vi) dysbiosis. TM significantly decreased fecal lipocalin-2, increased jejunal villi height and restored ratio *Firmicutes* to *Bacteroidetes*. Ga+SeY-enriched TM significantly increased villous height, decreased fecal calprotectin and increased abundance of bacteria important for gut health, including *Faecalibacterium prausnitzii* and *Akkermansia muciniphila*, compared to UE mice fed TM alone.

**Conclusions :** The present study demonstrated the potential of therapeutic milk enrichment with gum arabic and selenium-yeast to alleviate the impacts of undernutrition and enteropathy on gut barrier function.

**Keywords:** gum arabic, gut barrier, *Saccharomyces cerevisiae*, selenium-enriched yeasts, therapeutic milk, undernutrition

## **Abbreviations**

AgRP: Agouti-related peptide

BSA: Bovine Serum Albumin

CT: Control

EED: Environmental Enteric Dysfunction

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

GA: Gum Arabic

IL-1: Interleukin-1

LCN-2: Lipocalin-2

MPO: Myeloperoxidase

NPY : Neuropeptide Y

POMC : Pro-opiomelanocortin

SAM: Severe acute malnutrition

SEM: Standard error mean

SeY: Selenium-yeast

TM: Therapeutic Milk

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

UE: Undernutrition and Enteropathy



### **Highlights (85 mots max)**

- Experimental model of undernutrition and enteropathy induced body weight loss, intestinal and hypothalamic inflammation, gut hyperpermeability and caecal dysbiosis.
- Therapeutic milk improved signs of undernutrition and enteropathy by decreasing intestinal inflammation and by partially restoring dysbiosis.
- Gum Arabic and selenium-yeast enriched therapeutic milk further improved the response by (i) increasing villi height, (ii) by reducing gut inflammation and (iii) by increasing presence of bacteria important for gut health.
- Re-formulation of therapeutic milk with gum arabic and selenium-yeast may improve gut barrier function in SAM children with enteropathy.

## Introduction

Undernutrition is one of the leading contributor to the morbidity and mortality of children under the age of five [1]. Undernutrition leads to a rapid weight loss and induces an impaired immune response and a subsequently increased infection rate [2]. It is often associated with environmental enteric dysfunction (EED). EED may compromise nutritional therapeutic interventions [3]. Although EED etiology is still unknown but enteric infection or dysbiosis have been suggested as potential culprits [4,5]. Main EED features include gut hyperpermeability, low-grade inflammation and nutrients malabsorption [6].

Therapeutic management of severe acute malnutrition (SAM) occurs in hospitals or therapeutic centers [7]. The early phase of inpatient treatment is based on use of F-75 therapeutic milk (TM) [7], generally for 3 to 7 days [8]. F-75 is aimed to enhance metabolic homeostasis before the start of the second phase of refeeding which target catch-up growth [7]. Despite advances in nutritional science, F-75 has quasi identical composition since late 1990's [9].

We have previously developed a model of childhood undernutrition with enteropathy.

In this model, we aimed to improve gut barrier function by adding gum arabic and/or selenium-enriched Yeast (SeY) to a standard F-75 formula. Gum arabic, a fermentescible polysaccharides from acacia trees, has prebiotic properties [10], anti-inflammatory properties [10] and showed pro-absorptive effects in experimental model of diarrhea [11–13]. Selenium deficiencies are commonly observed in children with marasmus or Kwashiorkor syndrome [14,15]. Selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, Se-Y) is a common form of Se [16], known to improve weight gain and reduced diarrhea in early-weaned piglets [17] and to improve gut barrier function and decreased oxidative stress in mice with chemotherapy-induced mucositis [16]. Moreover, it has been shown, in mice with induced hepatitis, that combination of gum arabic with Se-Y played a synergetic effect on liver inflammation, compared to gum Arabic (GA) or Se-Y alone [18]. As dysbiosis has been described in undernourished children [19,20], we investigated microbiota from caecum content in the present

study. Children with severe acute malnutrition (SAM) also displayed decreased appetite [21] and mechanisms behind appetite loss may include hypothalamic inflammation [22,23] or altered central control of appetite [24]. We thus explored hypothalamic NPY and POMC mRNA in our preclinical model of undernutrition with EED.

Our study was designed to investigate the effect of F-75 enriched with with GA and/or SeY on (i) growth parameters and (ii) gut barrier function markers.

## Material and methods

### Ethics

Animal care and experimentation complied with both French and European community regulations (Official Journal of the European Community L 358, 18/12/1986). Investigators are authorized by the local ethic comity CENOMEXA (AFADIS#6185).

### Animals and treatment regimen

Post weaning three-week-old male C57BL/6 mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed into separate cages (5 per cage) and acclimatized for 1 week. During this period, mice were fed *ad libitum* with standard diet (Table 1 - A03 21.4% protein, 5.1% fat - SAFE, Augy, France) and had free access to tap water. Mice were housed in a climate-controlled facility with 12/12 light/dark cycle. Mice were randomized per cage and assigned to a specific regimen. At the end of each experiment, mice were killed by intraperitoneal injection of ketamine (40mg/kg) and xylazine (1mg/kg). Feces, caecal content, blood and jejunal samples were stored immediately at -80°C.

**Enteropathy development in a mouse undernutrition model** Mice were fed with standard (n=12) or isocaloric low protein diet (Table 1 - 5.8% of protein – n=70) for 14 days. To induce enteropathy, -UE mice were gavaged with indomethacin (2.5 mg/kg in 0.1 % dimethyl sulfoxide, n=12 for each group - Sigma Aldrich) [25] while control mice received the vehicle from D14 to D21.

**Therapeutic milk administration:** From D14 to D21, UE mice exclusively received either (i) low protein diet and tap water, (ii) therapeutic milk (Table 1 - n=12 -TM – Nutriset, Malaunay France), (iii) Gum Arabic-enriched TM (n=12 - GA-TM-10g/ml - Nexira, France), (iv) Selenium-Yeast- enriched TM

(SeY-TM n=12 – 27,6mg/L of selenium- *enriched Saccharomyces cerevisiae*, LHC, France) or (v) GA and SeY-enriched TM (n=12 – GA-SeY-TM).

**Growth and Body Weight** Body weight was recorded every day and tail length was measured at the end of the protocol to assess linear growth.

**Fecal calprotectin, myeloperoxidase and lipocalin-2 concentration** Mice feces from the colon were collected at D21, weighted, homogenized in 500  $\mu$ L PBS + 1% inhibitors (protease and phosphatase inhibitor cocktails, Sigma Aldrich) and centrifuged at 13000 g, 20 min. Supernatant was stored at -80°C. Fecal calprotectin, myeloperoxidase (MPO) and lipocalin-2 (LCN-2) production were assessed using a S100A8/S100A calprotectin, MPO and LCN-2 ELISA kit following manufacturer's instructions (R&D System, Mineapolis, USA).

**Intestinal permeability assessment** Intestinal permeability was assessed by serum Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-dextran flux concentration. Mice were fasted 6 hours before FITC-dextran gavage (60mg/kg). Three hours post gavage, plasma was collected *post-mortem*. FITC-dextran fluorescence level was measured by using a 96-well black plate reader (Chameleon V - Hidex, Turku, Finland) read with the excitation of 485nm and emission of 530 nm.

**Western Blot** Jejunal protein extraction has been performed as previously described [26]. Proteins were separated on a 4-20% gradient polyacrylamide gel (BioRad, Marnes la Coquette, France) and then transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad). Membranes were blocked with 4% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline plus 0,05% Tween 20 (TBST) for 1h at room temperature and then incubated with primary antibodies against claudin-1 overnight at 4°C (antibody dilution:

1:1000, ThermoFischer, Waltham, MA, USA) or GAPDH (1:1000 Sigma Aldrich). The membranes were washed with TBST and then incubated with secondary antibodies with 4% BSA (anti-Rabbit 1:5000, Dako, Glostrup, Denmark) for 1 hour at room temperature. After three washes, chemiluminescence detection system revealed immunocomplexes (GE Healthcare). Proteins bands were scanned (ImageScanner III; GE Healthcare) and analyzed.

**RT- qPCR** Total RNA from hypothalamus has been extracted as previously described [27]. First, 1.5 µg total RNA into cDNA by using 200 units of SuperScript™ II Reverse Transcriptase (ThermoFischer, Waltham, Massachusetts, USA) was used for Reverse Transcriptase as previously described [27]. SYBR™ Green technology on BioRad CFX96 real time PCR system (BioRad Laboratories, Marnes la Coquette, France) was used to perform qPCR in duplicate for each jejunal sample as previously described [27]. Hypothalamic TNF- $\alpha$ , IL-1B, NPY and POMC mRNA expression has been measured (Table 1 - Invitrogen, Waltham, MA, USA). GAPDH,  $\beta$ 2M and 18S were used as housekeeping genes, calculated and used as reference (Table 1).

Caecal content were weighted. DNA from mice caecal contents were extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), including a bead-beating step (0.1 mm zirconia silica beads, BioSpec products, Bartlesville, USA)[28]. 16S rDNA from *Eubacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* were amplified by qPCR (Table 2 - Invitrogen). qPCR was performed with a BioRad Thermocycler system (BioRad, USA) using Itaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad) for detection. Primers specificity was checked using Ribosomal Database Project tools (Cole et al., Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis, Nucleic Acids Res, 2014). Primers were validated by performing a calibration curve using serial dilution of DNA from caecal content. Primers were considered as acceptable when efficiency reaches values between 70% and 110%. All samples were run in duplicate in 96-well reaction plates.

Final concentrations were as follow: DNA (0.1 ng/μL, expect for *A. muciniphila* 1 ng/μL), primers 0.5 μM, and SYBR Green Supermix 1X. Thermocycling conditions were as follow: initiation step at 95°C 5 min; cycling stage at 95°C 5 s, 60°C 30 s (unless a different annealing temperature is indicated in Table S1), 95°C 15 s, 40 cycles; melt curve stage at 95°C 15 s, 65°C 15 s, increment of 1°C every 10 s until reaching 95°C. The purity of the amplified product was verified by analyzing the melt curve performed at the end of amplification. At least 80% of the duplicates show a variation lower than 0.5 Cq units. Serial dilution of DNA from cecal content was included on each plate to generate a relative curve and to integrate primer efficiency in the calculations. For detection of total Eubacteria, Cq of each sample were compared with a standard curve made by diluting genomic DNA extracted from a pure culture of *E. coli*, for which cell counts were determined prior to DNA isolation. Non-template controls were included on each plate. A qPCR is considered valid if the Cq of the non-template control is at least 3 units higher than the Cq of the templates or, for targets with low expression levels, if the melt curve of the non-template control was different from the templates."Into 96 wells, we diluted DNA (0.1 ng/μL, expect for *A. muciniphila* 1 ng/μL), primers 0.5 μM, and SYBR Green Supermix 1X in duplicates.

**Histology** Jejunum samples were embedded in paraffin. Sections of 4 mm were cut with a microtome and stained with a solution of hematoxylin-eosin-saffron (HES) as previously described [26]. Samples were blinded and analyzed with photonic VisionTek® live digital microscope (Sakura, The Netherlands). Histological analysis of jejunal villi height (μm), crypt depth (μm) and jejunal muscularis thickness (μm) were obtained with VisionTeck software (Sakura).

**Statistical analysis** Results were expressed as mean ± standard error mean (SEM) and were compared using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, United States). ANOVA was used for results with Gaussian distribution and for non-Gaussian results non-parametric Kruskal-Wallis has

been performed. These tests were followed respectively by Tukey or Dunn's post-tests. Pvalue<0.05 was considered significant.



## Results

### **Effect of low protein diet and indomethacin treatment on growth, enteropathy biomarkers, hypothalamic parameters and microbiota composition**

UE model induced weight loss (Fig.1a -  $15.6 \pm 0.5$  vs  $22.18 \pm 0.8$  g -  $P < 0.001$  vs control) and shorter tail length (Fig.1b -  $6.9 \pm 0.1$  vs  $7.5 \pm 0.1$  cm -  $P < 0.01$  vs control). Intestinal permeability assessed by plasmatic FITC-Dextran concentration was higher in UE group compared to control group (Fig.1c -  $11.6 \pm 5$  vs  $3.9 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$  -  $P < 0.05$ ). Jejunal tight junction protein claudin-1 expression did not differ among UE and control groups (Fig.1d). Enteropathy biomarkers, fecal LCN-2 and fecal calprotectin levels were higher in UE group compared to control group (Fig.1e and 1f -  $P < 0.01$  for both) while fecal MPO production did not significantly differ among UE and control groups. Intestinal architecture such as crypt hypertrophy has been observed in UE group (Fig.1h -  $72.0 \pm 10.7$  vs  $81.0 \pm 3.4$  -  $P < 0.05$  vs CT) while villi length (Fig.1g) and *muscularis* thickness was unchanged.

Hypothalamic inflammation was assessed by mRNA levels for pro-inflammatory cytokines  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$ . Hypothalamic  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  mRNA levels were higher in UE group compared to control group (Fig.3a and 3b -  $P < 0.05$  vs CT for both). As NPY/ POMC system plays a crucial role in the regulation of feeding behavior, we measured mRNA levels for NPY, an orexigenic neuropeptide and POMC, an anorexigenic peptide. UE mice displayed a higher ratio for NPY/POMC mRNA compared to control group (Fig.3c -  $49.0 \pm 17.2$  vs  $9.5 \pm 2.7$  relative expression -  $P < 0.01$  vs CT).

UE mice displayed a significantly higher ratio of *Firmicutes* to *Bacteroidetes* (Fig.2a -  $P < 0.01$ ), a lower abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* (Fig.2c -  $P < 0.001$ ) and a higher abundance of *Akkermancia muciniphila* (Fig.2d -  $P < 0.01$ ) compared to control group.

### **Effect of therapeutic milk or GA and/or SeY enriched- therapeutic milk on undernutrition, enteropathy biomarkers, hypothalamic parameters and microbiota composition**

Therapeutic milk, GA and/or SeY -enriched therapeutic milk did not significantly improved body weight, tail length, intestinal permeability or claudin-1 protein expression (Fig.1a, 1b, 1c and 1d). Therapeutic milk decreased fecal LCN-2 production (Fig.1e -  $P<0.01$  vs UE group). GA+SeY-enriched therapeutic milk significantly decreased fecal calprotectin (Fig.1f -  $6.2\pm 2.9$  vs  $0.1\pm 0.1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of feces -  $P<0.001$ ) and fecal MPO ( $2.4\pm 0.4$  vs  $4.7\pm 1.1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of feces -  $P<0.05$ ). GA+SeY-enriched therapeutic milk increased villous length (Fig.1g -  $393.4\pm 26.8$  vs  $303.5\pm 22.8$   $\mu\text{m}$  -  $P<0.05$ ) compared to TM group. Hypothalamic  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , POMC and NPY mRNA expression did not differ among therapeutic milk groups (Fig.3a, 3b and 3c).

Therapeutic milk did not alter *Firmicutes*, *F. Prausnitzii* and *A. muciniphila* abundance compared to UE group while TM mice displayed a higher abundance of *Lactobacillus* (Fig.2b -  $2.6\pm 2.6$  vs  $4.9 \cdot 10^7 \pm 1.5 \cdot 10^7$  AU -  $P<0.0001$  vs UE) and *Bacteroidetes* ( $1.0 \cdot 10^5 \pm 5.0 \cdot 10^7$  vs  $6.3 \cdot 10^6 \pm 1.4 \cdot 10^6$  AU -  $P<0.01$  vs UE). Therapeutic milk decreased ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio compared to UE group (Fig.2a -  $1.0\pm 0.1$  vs  $2.8\pm 0.8$  -  $P<0.01$  vs UE).

SeY-enriched therapeutic milk decreased *Lactobacillus* abundance compared to UE-TM (Fig.2b -  $2.1 \cdot 10^6 \pm 4.8 \cdot 10^7$  vs  $2.6\pm 2.6$   $P<0.0001$ ). GA-enriched milk increased *A. muciniphila* abundance (Fig.2d -  $2.7 \cdot 10^3 \pm 4.3 \cdot 10^4$  vs  $7.0 \cdot 10^4 \pm 2.0 \cdot 10^4$  UA -  $P<0.05$ ) compared to TM group. GA+SeY- enriched therapeutic milk increased *F. Prausnitzii* (Fig.2c -  $2.5 \cdot 10^5 \pm 1.6 \cdot 10^5$  vs  $4 \cdot 10^7 \pm 2 \cdot 10^7$  UA -  $P<0.001$ ) compared to TM group.

## Discussion

Undernutrition often occurs in combination with enteropathy [29]. In the present study, providing a low protein diet with repeated indomethacin gavages led to an experimental model of severe undernutrition with enteropathy (UE), characterized by a severe weight loss and an impaired gut barrier function. The effect on growth is in accordance with previous studies investigating the effect of protein-deficient diets [30,31]. The impact on gut barrier function, showed by the increased level of fecal calprotectin and fecal lipocalin-2 is also consistent with previous results. Indeed, two-weeks protein-deficient diets also increased lipocalin-2 levels in mice [32] as also observed in indomethacin-treated mice [33]. Moreover, higher fecal calprotectin levels have been observed in children hospitalized in Malawi for complicated SAM [29]. In our experiment, UE mice displayed a higher intestinal permeability. Intestinal permeability is a feature of enteropathy and is frequently assessed by lactulose-mannitol ratio in children. In young Bangladeshi children, higher lactulose-mannitol ratio is associated with undernutrition and infection [34]. We did not observe villous blunting in UE mice while villous blunting is extensively described in severe acute malnutrition with enteropathy [35].

As dysbiosis has been described in undernourished children [4,5], we investigated the impact of our model on caecal microbiota. UE mice had a lower *Faecalibacterium prausnitzii* abundance. *Faecalibacterium prausnitzii* exerts anti-inflammatory properties in intestinal homeostasis [36]. UE mice had a lower proportion of *Akkermansia muciniphila* as previously observed in indomethacin-treated mice [33,37].

As cognitive impairment is described in undernourished children, we investigated whether UE did impact hypothalamic markers. Hypothalamus is a key structure in feeding behavior. We observed that UE mice displayed higher mRNA levels for TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  into the hypothalamus. Mice with activity-based anorexia displayed as well higher hypothalamic IL-1 $\beta$  [38]. We also investigated NPY/POMC system that plays a crucial role in the regulation of feeding behavior. UE mice had a higher ratio NPY/POMC, suggesting an orexigenic profile. It may represent an adaptive response to protein-

energy undernutrition as we previously observed in mice with activity-based anorexia [39]. In addition, hypothalamic inflammation and food behavior are linked and *Hao et al* observed NPY/AgRH response inhibition by TNF- $\alpha$  in mice correlated with decreased food intake [24].

Feeding with F-75 therapeutic milk did not improve body weight or growth in UE mice. This was not unexpected since the use of F-75 therapeutic milk generally lasts 3 to 7 days and is not aimed at promoting growth but only at satisfying basal metabolism [8]. *Maldonado-Galdeano et al* described that feeding with fermented-milk was able to improve body weight in undernourished mice [40]. The discrepancy may result from milk protein composition: 10% in whole milk for Maldonado Galdeano's study and 5% for therapeutic milk F-75 in our study.

In the present study, feeding with therapeutic milk decreased fecal LCN-2 levels. A reduction of fecal LCN-2 levels has been shown in indomethacin-treated mice re-fed with donkey milk [33]. Feeding with therapeutic milk restored *Firmicutes* to *Bacteroidetes* ratio and therefore partially restored UE-induced dysbiosis. Feeding with therapeutic milk increased *Lactobacillus* levels as milk re-nutrition do in undernourished mice [41].

Enrichment of therapeutic milk with GA and SeY improved intestinal homeostasis more efficiently than enrichment with GA or SeY alone. GA and SeY supplementation already demonstrated synergetic effect on hepatic inflammation in mice with hepatic fibrosis [18]. GA+SeY-enriched therapeutic milk increased jejunal villous length suggesting a increased absorption surface. Moreover, GA+SeY-enriched therapeutic milk decreased fecal calprotectin levels compared to therapeutic milk alone suggesting anti-inflammatory properties. GA supplementation at 10g/L was described to decrease NF-kappa B, a key nuclear transcription factor involved in pro-inflammatory gene expression [42]. A recent study investigated the respective effect of selenium, yeast and selenium-enriched yeast in mice with chemically-induced colorectal cancer. The authors of this study

found combination of selenium with yeast have the more protective effect [43]. Indeed, selenium-enriched yeast decreased intestinal damage and prevented colorectal cancer progression in mice through up-regulation of p53, a key tumor suppressor [43].

GA+SeY-enriched therapeutic milk restored *Faecalibacterium prausnitzii* levels. *Faecalibacterium prausnitzii* is an abundant bacteria and is considered as a component of the healthy gut microbiota [44]. Administration of *Faecalibacterium prausnitzii* prevented chemically-induced colitis [45]. In a clinical study with obese patients, *Faecalibacterium prausnitzii* was negatively correlated with inflammatory markers such CRP or IL-6 levels [46]. Increased *Faecalibacterium prausnitzii* may be the reflect of a healthier gut or result from a decreased inflammatory response as stated by a reduced fecal calprotectin. Another explanation may lead from selenium status. Indeed, selenium nanoparticles supplementation in poultry was associated with increased beneficial bacteria such as *Faecalibacterium* and an increased amount of short-chain fatty acids [47]. Nevertheless, we did not observe this beneficial effect of SeY-enriched therapeutic milk.

GA- or GA-SeY-enriched therapeutic milk increased *Akkermansia muciniphila*. *Akkermansia muciniphila* is considered as a beneficial bacterium in the gut health. *Akkermansia muciniphila* treatment was for instance shown to restore mucus layer in mice with diet-induced obesity [48]. Whereas in our present study, SeY-enriched therapeutic milk decreased *Lactobacillus* abundance, it must be noted that effects of selenium on *Lactobacillus* are actually controversial in the literature. Supplementation with selenium nanoparticle increased the *Lactobacillus* abundance in poultry [47]. By contrast, effect of selenium on *Lactobacillus* is dependent of the selenium source in heat-stressed pigs: sodium selenite treatment decreased *Lactobacillus* while selenium-enriched yeasts increased their proportion [49].

**In conclusion**, the development of a UE model provides a simple and affordable tool to study features associated with undernutrition and enteropathy. This study demonstrated that

consumption of GA+SeY-enriched therapeutic milk alleviates some of the signs of undernutrition and enteropathy compared to standard therapeutic milk. GA+SeY-enriched therapeutic milk did not improve hypothalamic parameters, further investigations are required to improve therapeutic milk to consider central benefits. GA+SeY-enriched therapeutic milk increased villi length suggesting a better nutrient absorption surface. It decreased intestinal inflammation biomarker such as fecal calprotectin. It improved dysbiosis by increasing beneficial bacteria involved in gut health such as *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii*.

## **Acknowledgements**

## **Statement of Authorship**

## **Conflict of Interest Statement**

E. Salameh, F. Morel and M. Zeilani work for Nutriset, a private company manufacturing therapeutic milk F-75 and which provided financial support to the study. Other authors do not declare any conflict of interest related to this study.

**Source of support:** This study was supported by Nutriset SAS and the National Association of Research and Technology (ANRT) within the framework of a CIFRE convention, and the Charles Nicole Foundation.

## References

- [1] Unicef UNCF, (who) WHO, wb] WB. Levels and Trends in Child Malnutrition. eSocialSciences; 2018.
- [2] Rytter MJH, Kolte L, Briend A, Friis H, Christensen VB. The immune system in children with malnutrition--a systematic review. PLoS ONE 2014;9:e105017. doi:10.1371/journal.pone.0105017.
- [3] Attia S, Versloot CJ, Voskuil W, van Vliet SJ, Di Giovanni V, Zhang L, et al. Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational cohort study. Am J Clin Nutr 2016;104:1441–9. doi:10.3945/ajcn.116.130518.
- [4] Kosek MN, MAL-ED Network Investigators. Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. EBioMedicine 2017;18:109–17. doi:10.1016/j.ebiom.2017.02.024.
- [5] Vonaesch P, Rendremanana R, Gody J-C, Collard J-M, Giles-Vernick T, Doria M, et al. Identifying the etiology and pathophysiology underlying stunting and environmental enteropathy: study protocol of the AFRIBIOTA project. BMC Pediatrics 2018;18:236. doi:10.1186/s12887-018-1189-5.
- [6] George CM, Burrowes V, Perin J, Oldja L, Biswas S, Sack D, et al. Enteric Infections in Young Children are Associated with Environmental Enteropathy and Impaired Growth. Trop Med Int Health 2018;23:26–33. doi:10.1111/tmi.13002.
- [7] Ashworth A, Chopra M, McCoy D, Sanders D, Jackson D, Karaolis N, et al. WHO guidelines for management of severe malnutrition in rural South African hospitals: effect on case fatality and the influence of operational factors. The Lancet 2004;363:1110–5. doi:10.1016/S0140-6736(04)15894-7.
- [8] Burza S, Mahajan R, Marino E, Sunyoto T, Shandilya C, Tabrez M, et al. Community-based management of severe acute malnutrition in India: new evidence from Bihar. Am J Clin Nutr 2015;101:847–59. doi:10.3945/ajcn.114.093294.
- [9] Tickell KD, Denno DM. Inpatient management of children with severe acute malnutrition: a review of WHO guidelines. Bulletin of the World Health Organization 2016;94:642–51. doi:10.2471/BLT.15.162867.
- [10] Ali BH, Al-Husseni I, Beegam S, Al-Shukaili A, Nemmar A, Schierling S, et al. Effect of Gum Arabic on Oxidative Stress and Inflammation in Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats. PLOS ONE 2013;8:e55242. doi:10.1371/journal.pone.0055242.



- [11] Wapnir RA, Wingertzahn MA, Moyses J, Teichberg S. Gum Arabic Promotes Rat Jejunal Sodium and Water Absorption From Oral Rehydration Solutions in Two Models of Diarrhea. *Gastroenterology* 1997;112:1979–1985.
- [12] Teichberg S, Wingertzahn MA, Moyses J, Wapnir RA. Effect of gum arabic in an oral rehydration solution on recovery from diarrhea in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:411–7.
- [13] Ballal A, Bobbala D, Qadri SM, Föller M, Kempe D, Nasir O, et al. Anti-malarial effect of gum arabic. *Malaria Journal* 2011;10:139. doi:10.1186/1475-2875-10-139.
- [14] Ashour MN, Salem SI, El-Gadban HM, Elwan NM, Basu TK. Antioxidant status in children with protein-energy malnutrition (PEM) living in Cairo, Egypt. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:669–73.
- [15] Salih MA, Mohamed EF, Galgan V, Jones B, Hellsing K, Bani IA, et al. Selenium in malnourished Sudanese children: status and interaction with clinical features. *Ann Nutr Metab* 1994;38:68–74. doi:10.1159/000177795.
- [16] Porto BAA, Monteiro CF, Souza ÉLS, Leocádio PCL, Alvarez-Leite JI, Generoso SV, et al. Treatment with selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 partially ameliorates mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2019;84:117–26. doi:10.1007/s00280-019-03865-8.
- [17] Xu J, Li Y, Yang Z, Li C, Liang H, Wu Z, et al. Yeast Probiotics Shape the Gut Microbiome and Improve the Health of Early-Weaned Piglets. *Front Microbiol* 2018;9:2011. doi:10.3389/fmicb.2018.02011.
- [18] Hamid M, Abdulrahim Y, Liu D, Qian G, Khan A, Huang K. The Hepatoprotective Effect of Selenium-Enriched Yeast and Gum Arabic Combination on Carbon Tetrachloride-Induced Chronic Liver Injury in Rats. *J Food Sci* 2018;83:525–34. doi:10.1111/1750-3841.14030.
- [19] Million M, Diallo A, Raoult D. Gut microbiota and malnutrition. *Microb Pathog* 2017;106:127–38. doi:10.1016/j.micpath.2016.02.003.
- [20] Pham T-P-T, Tidjani Alou M, Bachar D, Levasseur A, Brah S, Alhousseini D, et al. Gut Microbiota Alteration is Characterized by a Proteobacteria and Fusobacteria Bloom in Kwashiorkor and a Bacteroidetes Paucity in Marasmus. *Sci Rep* 2019;9:9084. doi:10.1038/s41598-019-45611-3.
- [21] Yebyo HG, Kendall C, Nigusse D, Lemma W. Outpatient Therapeutic Feeding Program Outcomes and Determinants in Treatment of Severe Acute Malnutrition in Tigray, Northern Ethiopia: A Retrospective Cohort Study. *PLOS ONE* 2013;8:e65840. doi:10.1371/journal.pone.0065840.

- [22] Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:401–6. doi:10.1097/01.mco.0000078983.18774.cc.
- [23] Grant RW, Stephens JM. Fat in flames: influence of cytokines and pattern recognition receptors on adipocyte lipolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015;309:E205-213. doi:10.1152/ajpendo.00053.2015.
- [24] Hao L, Sheng Z, Potian J, Deak A, Rohowsky-Kochan C, Routh VH. Lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) blunt the response of Neuropeptide Y/Agouti-related peptide (NPY/AgRP) glucose inhibited (GI) neurons to decreased glucose. *Brain Res* 2016;1648:181–92. doi:10.1016/j.brainres.2016.07.035.
- [25] Whitfield-Cargile CM, Cohen ND, Chapkin RS, Weeks BR, Davidson LA, Goldsby JS, et al. The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes* 2016;7:246–261. doi:10.1080/19490976.2016.1156827.
- [26] Salameh E, Meleine M, Gourcerol G, do Rego J-C, do Rego J-L, Legrand R, et al. Chronic colitis-induced visceral pain is associated with increased anxiety during quiescent phase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2019. doi:10.1152/ajpgi.00248.2018.
- [27] Charpentier C, Chan R, Salameh E, Mbodji K, Ueno A, Coëffier M, et al. Dietary n-3 PUFA May Attenuate Experimental Colitis. *Mediators Inflamm* 2018;2018:8430614. doi:10.1155/2018/8430614.
- [28] Doré, J, Ehrlich S.D, Levenez, F, Pelletier, E, Alberti, A., Bertrand, L, et al. IHMS - QUALITY PROTOCOL SOP FOR FECAL SAMPLES DNA EXTRACTION Protocol Q 2015.
- [29] Attia S, Versloot CJ, Voskuil W, van Vliet SJ, Di Giovanni V, Zhang L, et al. Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational cohort study. *Am J Clin Nutr* 2016;104:1441–9. doi:10.3945/ajcn.116.130518.
- [30] Brown EM, Wlodarska M, Willing BP, Vonaesch P, Han J, Reynolds LA, et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. *Nature Communications* 2015;6:7806. doi:10.1038/ncomms8806.
- [31] Sampaio IC, Medeiros PHQS, Rodrigues F a. P, Cavalcante PA, Ribeiro SA, Oliveira JS, et al. Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. *Braz J Med Biol Res* 2016;49:e5340. doi:10.1590/1414-431X20165340.
- [32] Mayneris-Perxachs J, Bolick DT, Leng J, Medlock GL, Kolling GL, Papin JA, et al. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype. *Am J Clin Nutr* 2016;104:1253–62. doi:10.3945/ajcn.116.131797.

- [33] Yvon S, Olier M, Leveque M, Jard G, Tormo H, Haimoud-Lekhal DA, et al. Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *Eur J Nutr* 2018;57:155–66. doi:10.1007/s00394-016-1304-z.
- [34] Hossain MI, Haque R, Mondal D, Mahfuz M, Ahmed AS, Islam MM, et al. Undernutrition, Vitamin A and Iron Deficiency Are Associated with Impaired Intestinal Mucosal Permeability in Young Bangladeshi Children Assessed by Lactulose/Mannitol Test. *PLoS ONE* 2016;11:e0164447. doi:10.1371/journal.pone.0164447.
- [35] Attia S, Feenstra M, Swain N, Cuesta M, Bandsma RHJ. Starved Guts: Morphologic and Functional Intestinal Changes in Malnutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017;65:491–5. doi:10.1097/MPG.0000000000001629.
- [36] Rossi O, van Berkel LA, Chain F, Tanweer Khan M, Taverne N, Sokol H, et al. Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci Rep* 2016;6:18507. doi:10.1038/srep18507.
- [37] Maseda D, Zackular JP, Trindade B, Kirk L, Roxas JL, Rogers LM, et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Alter the Microbiota and Exacerbate Clostridium difficile Colitis while Dysregulating the Inflammatory Response. *MBio* 2019;10. doi:10.1128/mBio.02282-18.
- [38] Belmonte L, Achamrah N, Nobis S, Guérin C, Riou G, Bôle-Feysot C, et al. A role for intestinal TLR4-driven inflammatory response during activity-based anorexia. *Sci Rep* 2016;6:35813. doi:10.1038/srep35813.
- [39] L'Huillier C, Jarbeau M, Achamrah N, Belmonte L, Amamou A, Nobis S, et al. Glutamine, but not Branched-Chain Amino Acids, Restores Intestinal Barrier Function during Activity-Based Anorexia. *Nutrients* 2019;11:1348. doi:10.3390/nu11061348.
- [40] Maldonado Galdeano C, Novotny Núñez I, de Moreno de LeBlanc A, Carmuega E, Weill R, Perdígón G. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-malnutrition model in mice. *BMC Gastroenterology* 2011;11:64. doi:10.1186/1471-230X-11-64.
- [41] Allori C, Agüero G, de Ruiz Holgado AP, de Nader OM, Perdígón G. Gut mucosa morphology and microflora changes in malnourished mice after renutrition with milk and administration of Lactobacillus casei. *J Food Prot* 2000;63:83–90.
- [42] Wapnir RA, Sheery B, Codipilly CN, Goodwin LO, Vancurova I. Modulation of Rat Intestinal

Nuclear Factor NF- $\kappa$ B by Gum Arabic. *Digestive Disease and Sciences* 2008;53:80–87. doi:10.1007/s10620-007-9826-0.

[43] Abedi J, Saatloo MV, Nejati V, Hobbenaghi R, Tukmechi A, Nami Y, et al. Selenium-Enriched *Saccharomyces cerevisiae* Reduces the Progression of Colorectal Cancer. *Biol Trace Elem Res* 2018;185:424–32. doi:10.1007/s12011-018-1270-9.

[44] Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:255–61. doi:10.1016/j.mib.2013.06.003.

[45] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:16731–6. doi:10.1073/pnas.0804812105.

[46] Furet J-P, Kong L-C, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 2010;59:3049–57. doi:10.2337/db10-0253.

[47] Gangadoo S, Dinev I, Chapman J, Hughes RJ, Van TTH, Moore RJ, et al. Selenium nanoparticles in poultry feed modify gut microbiota and increase abundance of *Faecalibacterium prausnitzii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102:1455–66. doi:10.1007/s00253-017-8688-4.

[48] Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:9066–71. doi:10.1073/pnas.1219451110.

[49] Lv CH, Wang T, Regmi N, Chen X, Huang K, Liao SF. Effects of dietary supplementation of selenium-enriched probiotics on production performance and intestinal microbiota of weanling piglets raised under high ambient temperature. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2015;99:1161–1171. doi:10.1111/jpn.12326.

**Table 1 – Diet composition**

	<b>CT</b>	<b>LP</b>	<b>TM</b>	<b>GA-TM</b>	<b>SeY-TM</b>	<b>GA-SeY-TM</b>
	<b>g/100g</b>	<b>g/100g</b>	<b>g/100mL</b>	<b>g/100mL</b>	<b>g/100mL</b>	<b>g/100mL</b>
<b>Proteins</b>	21,4	5,8	0,9625	0,9025	0,9608	0,9008
<b>Fats</b>	5,1	6	2,567	2,407	2,5626	2,4026
<b>Carbohydrates</b>	52	72	12,5125	11,7325	12,491	11,711
<b>GA</b>	-	-	-	1	-	1
<b>SeY</b>	-	-	-	-	0,0276	0,0276
<b>Thixogum™</b>	-	-	0,12	0,12	0,12	0,12

**Table 2:** PCR and sequencing primers used.

<i>Gene</i>	<i>Hybridation temperature (°C)</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	65	TGTCTACTCCTCAGAGCCCC	TGAGTCCTTGATGGTGGTGC
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	64	CCCAAAGATGAAGGGCTGC	AAGGTCCACGGGAAAGACAC
<b>NPY</b>	56	CTGCGACTACTACATCAATCT	CTTCAAGCCTTGTCTGG
<b>POMC</b>	62	CCTCCTGCTTCAGACCTCCA	GGCTGTTTATCTCCGTTGC
<b>GAPDH</b>	60	CATCACTGCCACTCAGAAGA	AAGTCACAGGAGACAACCT
<b>18S</b>	60	TGCGAGTACTCAACACCAACA	TTCCTCAACACCACATGAGC
<b><math>\beta</math>2M</b>	60	GCCGAACATACTGAACTGCTAC	GCTGAAGAACATATCTGACATCTC
<b>Eubactéries</b>	60	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	ATTACCGCGGCTGCTGG
<b>Bacteroidetes</b>	51	CATGTGGTTTAATTCGATGAT	AGCTGACGACAACCATGCAG
<b>Firmicutes</b>	51	ATGTGGTTTAATTCGAAGCA	AGCTGACGACAACCATGCAC
<b>Lactobacillus</b>	58	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	CACCGCTACACATGGAG
<b><i>Faecalibacterium prausnitzii</i></b>	60	GATGGCCTCGCGTCCGATTAG	CGAAGACCTTCTTCTCTCC
<b><i>Akkermansia muciniphila</i></b>	60	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT

**Figure Legends**

**Figure 1: Impact of diets on gut barrier function.** 3-weeks-old C57BL/6 mice were fed with standard or low protein diet (5.8%) for 21 days. At day 14, indomethacin (2.5 mg/kg) or vehicle gavage was performed once a day for 7 days. (a) Body weight (n=10-12 per group), (b) tail length (n=10-12 per group), (c) serum FITC-dextran concentration (assessed 3 h post *per os* administration; n=8-12 per group), (d) jejunal claudin-1 protein expression (n=5-11 per group), (e) fecal calprotectin (n=7-12 per group), (f) lipocalin-2 (LCN-2) (n=5-12 per group) and (g and h) villus height and crypt depth (n=7-10 per group) were measured. Bars indicate the mean  $\pm$ SEM. One-way analysis of variance with *posthoc* Tukey's test was performed to assess therapeutic milk impact (\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ) or therapeutic milk enriched with gum arabic and/or selenium yeast (a, b values without common letters differs). CT, control diet; UE undernutrition and enteropathy; UE+TM undernutrition and enteropathy + therapeutic milk; UE+GA-TM undernutrition and enteropathy + therapeutic milk enriched with gum arabic; UE+SeY-TM undernutrition and enteropathy + therapeutic milk enriched with selenium-yeast; UE+GA-SeY-TM+ undernutrition and enteropathy + therapeutic milk enriched with gum arabic and selenium-yeast.

**Figure 2: Impact of diets on caecal microbiota composition.** 3-weeks-old C57BL/6 mice were fed with standard or low protein diet for 21 days. At day 14, indomethacin (2.5 mg/kg) gavage or vehicle was performed once a day for 7 days. (a) *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio (n=7-12 per group), (b) *Lactobacillus* (n=7-12 per group), (c) *Faecalibacterium prausitzii* (n=7-12 per group) and (d) *Akkermansia muciniphila* (n=7-12 per group) abundance in caecal content are expressed as arbitrary units (AU) per g of caecal content. Bars indicate the mean  $\pm$ SEM. One-way analysis of variance with *posthoc* Tukey's test was performed to assess therapeutic milk impact (\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  \*\*\*\* $P < 0.0001$ ) or therapeutic milk enriched with gum arabic and/or selenium yeast (a, b values without common letters differs). CT, control diet; UE undernutrition and enteropathy; UE+TM undernutrition and enteropathy + therapeutic milk; UE+GA-TM undernutrition and

enteropathy + therapeutic milk enriched with gum arabic; UE+SeY-TM undernutrition and enteropathy + therapeutic milk enriched with selenium-yeast; UE+GA-SeY-TM+ undernutrition and enteropathy + therapeutic milk enriched with gum arabic and selenium-yeast.

**Figure 3: Impact of diets on hypothalamic inflammation and food intake regulation.** 3-weeks-old mice were fed with standard or low protein diet for 21 days. At day 14, indomethacin (2.5 mg/kg) gavage was performed once a day for 7 days. (a) TNF- $\alpha$  (n=6-11 per group), (b) IL1- $\beta$  (n=8-11 per group) and (c) NPY/POMC ratio (n=8-12 per group) relative expression into the hypothalamus were measured. Bars indicate the mean  $\pm$ SEM. One-way analysis of variance with *posthoc* Tukey's test was performed to assess therapeutic milk impact (\*P<0.05 \*\*P<0,01) or therapeutic milk enriched with gum arabic and/or selenium yeast (a, b values without common letters differs). CT, control diet; UE undernutrition and enteropathy; UE+TM undernutrition and enteropathy + therapeutic milk; UE+GA-TM undernutrition and enteropathy + therapeutic milk enriched with gum arabic; UE+SeY-TM undernutrition and enteropathy + therapeutic milk enriched with selenium-yeast; UE+GA-SeY-TM+ undernutrition and enteropathy + therapeutic milk enriched with gum arabic and selenium-yeast.



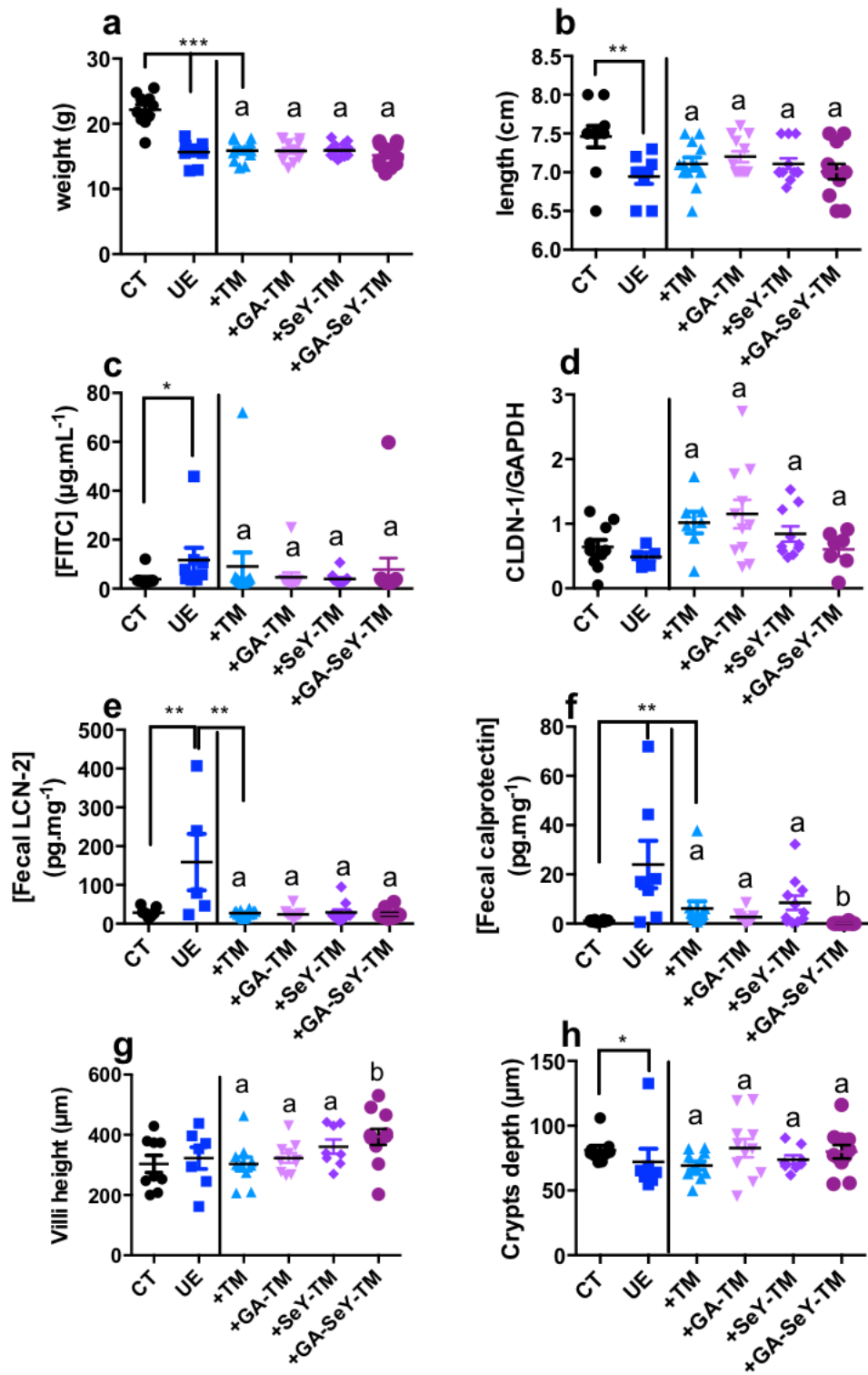


Figure 1

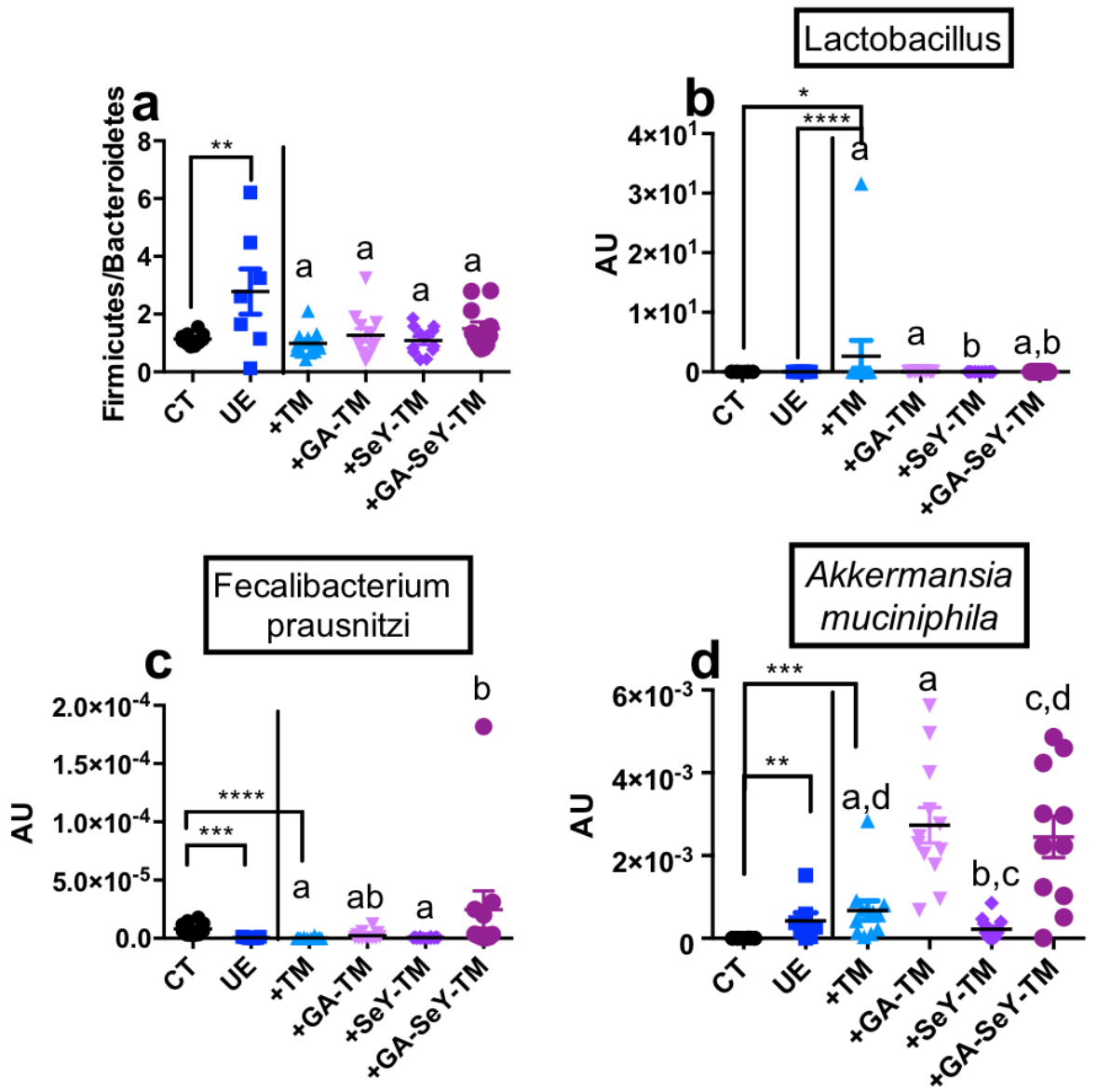


Figure 2

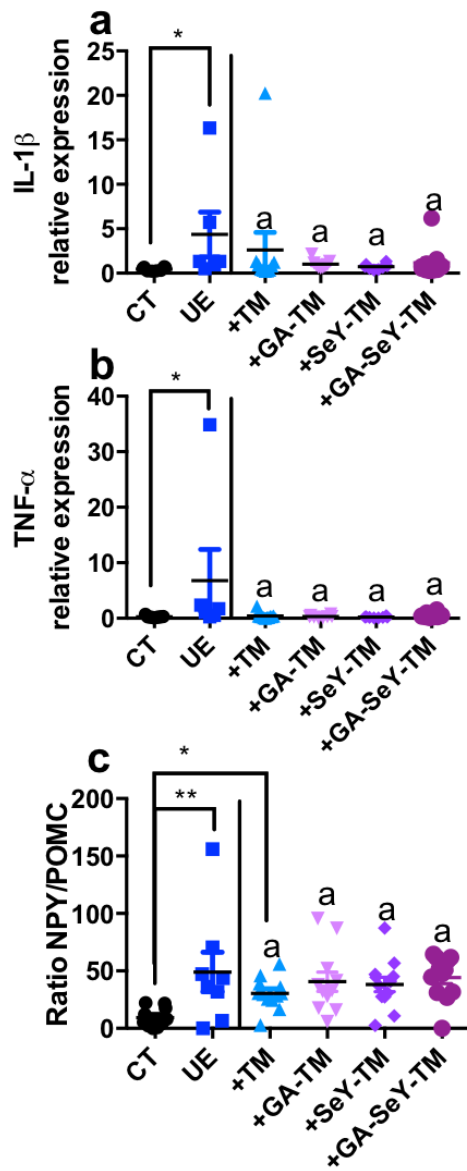


Figure 3

## Chapitre 3 - Discussion générale et perspectives

### 1. Discussion générale et perspectives

La malnutrition aiguë sévère (MAS) est un problème majeur de santé publique dans le monde caractérisée par une perte de poids rapide (tissus musculaire et adipeux) ou une impossibilité de prendre du poids (2). De plus en plus de données indiquent la présence d'une dysfonction entérique environnementale (DEE) dans les pays à faibles revenus et revenus intermédiaires et plus particulièrement dans les zones contaminées par des bactéries pathogènes (146,151,152). La DEE se caractérise par (i) une augmentation de la perméabilité intestinale, (ii) une inflammation et (iii) une diminution de l'absorption des nutriments (7,8). Les causes de la DEE sont encore inconnues mais supposent l'ingestion de bactéries fécales induisant une infection entérale (MAL-ED) ou une dysbiose (AFRIBIOTA) (138,139). En raison de cette diminution de l'absorption des nutriments, la DEE aurait un effet additionnel dans le développement ou dans l'aggravation de l'état de dénutrition.

L'Organisation Mondiale de la Santé préconise l'utilisation du lait thérapeutique F-75 durant la phase de stabilisation nutritionnelle (Phase 1) chez les enfants atteints de MAS avec complications médicales (2). Le lait thérapeutique F-75 est pauvre en protéines (5% de l'énergie totale) et en sodium (2). Il a été formulé afin de restaurer les fonctions métaboliques et stabiliser le statut clinique durant une courte période allant de 3 à 7 jours (10). Il permet également d'améliorer la motricité digestive et l'absorption intestinale des nutriments (277). Cette phase de stabilisation précède celle de transition durant laquelle le personnel soignant augmente la quantité d'énergie ingérée afin de préparer l'enfant à la phase 2 du protocole de prise en charge : la reprise de poids (278). Cette phase peut être impactée en raison d'une malabsorption nutritionnelle caractéristique de la DEE (9). De plus, la composition du lait F-75 n'a pas été reformulée depuis ces 20 dernières années (279). Dans ce contexte, la formulation du F-75 devrait donc être optimisée afin d'améliorer la fonction de barrière intestinale et induire une meilleure absorption des nutriments.

Pour cela, différents objectifs ont été mis en œuvre durant cette thèse.

- 1) Dans l'étude n°1, nous avons mis en place un modèle de MAS avec DEE chez la souris. Cette étude fait l'objet d'un article soumis à la revue « *Journal of Nutrition* ». Dans cet article, la dénutrition a été induite par un régime pauvre en protéines (5,8%) durant trois semaines. La DEE a été induite par un gavage quotidien d'une dose d'indométacine (2,5mg/kg de poids de souris) durant sept jours de J14 à J21 (*Étude 1*). Nous avons complété la caractérisation du

modèle dans l'étude n°3 par des paramètres hypothalamiques et des paramètres du microbiote caecal.

- 2) Dans l'étude n°2, le lait thérapeutique F-75 a été supplémenté avec de la glutamine (4%) et de la leucine (1%) et testé sur le modèle MAS-DEE. Cette formulation a permis de diminuer l'impact de la perte de poids sans pour autant corriger la perméabilité intestinale et la production de calprotectine fécale. Néanmoins, la supplémentation de glutamine et de leucine a induit une augmentation de l'expression en ARNm codant pour TNF- $\alpha$  et claudine-2 dans ce modèle (*Étude 2*).
- 3) Dans l'étude n°3, le lait thérapeutique F-75 a été par la suite enrichi avec de la gomme arabique et/ou des levures sélénées. Cette étude montre que le lait thérapeutique F-75 seul est capable de diminuer l'inflammation intestinale caractérisée par une diminution de la production fécale de calprotectine et de lipocaline-2 sans pour autant impacter la perméabilité intestinale. Le lait thérapeutique F-75 a également corrigé partiellement la dysbiose. La gomme arabique associée aux levures sélénées ont un impact additionnel sur la diminution de l'inflammation intestinale et sur l'augmentation de l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* (*Étude 3*).

Ainsi, cette discussion sera divisée en 3 axes principaux. Nous discuterons tout d'abord 1) du modèle murin développé, puis de 2) l'impact du lait thérapeutique supplémenté en glutamine et en leucine pour finir sur 3) l'étude de l'effet de la supplémentation en gomme arabique et/ou levures sélénées sur les paramètres de la DEE.

## 1.1. Développement du modèle de dénutrition avec dysfonction entérique environnementale.

### 1.1.1. Quelles ont été les premières étapes de développement du modèle de dénutrition avec dysfonction entérique environnementale ?

La mise en place du modèle de dénutrition avec DEE a été le premier objectif de cette thèse. Nous avons rencontré quelques difficultés pour développer le modèle de dénutrition avec entéropathie et cela a pris environ 2 ans.

La première approche a été d'étudier l'impact d'un régime pauvre en protéines (5,8%) et d'une restriction calorique (-50% par rapport aux souris ayant eu un régime standard) durant 3 semaines sur le développement du retard de croissance staturo-pondéral et de la DEE. Ces deux régimes alimentaires ont induit un retard de croissance, en adéquation avec les données de la littérature (11,280). Néanmoins, ces derniers n'ont pas impacté la perméabilité intestinale jéjunale. Cela concorde avec l'étude d'*Eyzaguirre et al.* où un régime pauvre en protéines (4%) durant 3 semaines ne modifie pas la perméabilité iléale chez le rat (281). De plus, nous n'avons pas détecté d'inflammation intestinale. Ces résultats sont en accord avec les études de *Brown et al.* (11). Pour la suite de l'étude, nous avons décidé d'utiliser le régime hypoprotéiné car il induit une perte de poids plus importante dans cette étude que la restriction calorique. De plus, la restriction calorique peut engendrer du stress (280,282). En effet, il a été décrit dans la littérature une augmentation des taux de corticostérone plasmatique chez des souris ayant subi une restriction calorique de 25% (280). De plus, une autre étude a montré qu'une restriction calorique de 50% chez la souris induisait un comportement anxieux et dépressif suite aux tests de la nage forcée ou du labyrinthe en O (282).

La deuxième étape a été de combiner la dénutrition induite par un régime pauvre en protéines (5,8%) avec un autre protocole capable d'induire une entéropathie. Dans la littérature, *Brown et al.* ont utilisé un cocktail bactérien composé de *Bacteroidetes* et d'*Escherichia coli* dans un modèle de souris dénutries par un régime hypoprotéiné (7%) et sont parvenus à induire un retard de croissance pondéral plus important et une DEE caractérisée par (i) une augmentation de la production de calprotectine fécale, (ii) une augmentation plus importante de la perméabilité intestinale et (iii) une diminution de la taille des villosités jéjunales (11). Notre laboratoire ne possède pas de locaux adaptés pour l'utilisation de certaines bactéries pathogènes. L'utilisation de la zone septique dans l'animalerie était une option envisagée mais déclinée en raison de sa faible disponibilité.

Nous avons testé l'utilisation de lipopolysaccharides (LPS), composant de la paroi externe des bactéries gram négatives pour induire une entéropathie. En effet, le LPS est capable d'activer

l'inflammation intestinale dans des modèles murins d'endotoxémie (283,284). De plus, le LPS a également été utilisé dans un modèle de dénutrition protéique et a permis de développer une stéatose hépatique caractéristique du syndrome de Kwashiorkor mais les auteurs ne se sont pas intéressés à l'impact de l'injection de ce composant sur le développement d'une DEE (285). En parallèle, nous avons testé une 2<sup>ème</sup> approche d'entéropathie induite par l'indométacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), déjà utilisée dans des modèles murins (286–289). Le développement de l'entéropathie impliquerait l'inhibition de COX-2 par l'indométacine et par conséquent une diminution de prostaglandine E2 (PGE2) inhibant la production de mucus (290). L'indométacine serait également capable de diffuser dans la membrane plasmique, d'interagir avec les phospholipides, de modifier sa fluidité et sa perméabilité en induisant par exemple la formation de radeaux lipidiques menant à une altération de la fonction de barrière (289).

Dans cette étude, le régime pauvre en protéines pendant 2 semaines induit un retard staturo-pondéral. L'injection en i.p. de LPS n'a pas induit d'hyperperméabilité ou d'inflammation intestinale. Cela pourrait s'expliquer (i) soit par une diminution de l'efficacité du système immunitaire ou (ii) de l'effet transitoire du LPS. *Fock et al* a mis en évidence dans un modèle de dénutrition protéique une leucopénie et une réponse immunitaire diminuée caractérisée par une augmentation de la production d'IL-10 anti-inflammatoire et une diminution de la production d'IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  24h après une injection intra-caudale de LPS (291). Concernant l'hyperperméabilité intestinale, dans les modèles d'endotoxémie chez le rongeur, l'effet du LPS sur ce paramètre ne semble pas dépasser 48h suggérant un effet transitoire de ce traitement (283,284). L'injection unique d'indométacine dans notre modèle ne modifie pas non plus l'hyperperméabilité globale alors que nous observons une augmentation de la production de calprotectine fécale 4 jours après l'injection i.p. (10mg/kg). Ces effets ont également été observés après le gavage unique d'une même dose d'indométacine dans un modèle aigu de dénutrition induit par une semaine de régime pauvre en protéines (5,8%) chez la souris. Dans une étude chez la souris, un gavage unique d'indométacine (20mg/kg) induit aussi une augmentation de la production de calprotectine fécale 4 jours après le traitement alors que l'hyperperméabilité intestinale n'est observable que durant les premières 24h suggérant son effet transitoire (292).

### 1.1.2. Quel modèle de dénutrition avec dysfonction entérique environnementale a été validé ? Est-il proche des observations cliniques ? Quelles sont les limites de ce modèle ?

Nous avons alors émis l'hypothèse que l'effet de l'indométacine était transitoire. Pour améliorer notre modèle, nous avons pris contact avec Dr Noah Cohen et Dr Canaan Whitfield-Cargille de l'université du Texas aux États-Unis afin de discuter des modèles d'entéropathie par indométacine. Cohen et al utilisent ce modèle chez la souris normonutrie. Ils utilisent un protocole expérimental d'induction de l'entéropathie chronique par un gavage quotidien d'une dose d'indométacine (5mg/kg de poids de souris) durant 6 jours chez des souris ayant reçu une alimentation standard (286). Dans un premier temps, nous avons induit une dénutrition durant 3 semaines grâce à un régime pauvre en protéines (5,8% de protéine) puis l'entéropathie chronique a été induite par un gavage quotidien d'indométacine (5mg/kg). Néanmoins, nous avons eu une mortalité très importante dans le groupe dénutri ayant reçu ces gavages. Nous avons donc décidé dans un second temps d'induire l'entéropathie chez des souris dénutries en testant des doses plus faibles : 1 et 2,5 mg/kg. Nous discuterons par la suite de l'impact de la dose la plus élevée sur l'induction du retard de croissance staturo-pondéral et sur le développement de la dysfonction de barrière intestinale chez ces souris. Dans l'étude n°3, nous avons préalablement évalué le comportement alimentaire et la composition du microbiote caecal.

#### *Retard de croissance staturo-pondéral*

Dans ce modèle, un retard de croissance staturo-pondéral a été induit par la combinaison du régime pauvre en protéines et les gavages répétés d'indométacine. Comme la malnutrition aiguë se définit par un retard de croissance pondéral alors que la croissance linéaire est caractéristique de la malnutrition chronique (2), ce dernier paramètre serait une limite au modèle puisque l'objectif de cette thèse a été de développer un modèle de dénutrition sévère et non chronique. Afin de confirmer ce paramètre de retard de croissance linéaire, il serait intéressant de mesurer la croissance par la mesure de la longueur du tibia (293) ou encore la taille de l'animal du museau jusqu'à la partie distale de la queue (294).

En plus des paramètres de croissance, la fonction de barrière a été étudiée dans ce modèle. Nous commencerons par la perméabilité intestinale, puis l'inflammation pour finir sur l'étude de la composition du microbiote intestinal.

#### *La fonction de barrière : la perméabilité intestinale*



Une étude observationnelle de *Farrás et al* en Zambie indique une augmentation de la perméabilité intestinale suite au test du lactulose et du mannitol ainsi qu'une atrophie des villosités de la paroi duodénale chez des enfants atteints de MAS avec entéropathie (181). Dans notre modèle, les gavages des souris dénutries avec la plus haute dose d'indométacine induisent, une augmentation de la perméabilité intestinale globale avec une diminution de l'expression en ARNm codant pour certaines protéines de jonctions serrées telles que CLDN-2 et occludine. Cependant, notre modèle n'impacte pas l'architecture des villosités et des cryptes de la paroi jéjunale.

#### *La fonction de barrière : l'inflammation intestinale*

La calprotectine fécale est un marqueur de l'inflammation intestinale (198). Dans les trois études, nous avons observé une augmentation de l'inflammation intestinale par l'augmentation de ce paramètre. Une augmentation de sa production a été observée chez des enfants atteints de la MAS et associée à la mortalité (9,295). Une autre étude montre une augmentation de la sécrétion de calprotectine fécale suite à un gavage quotidien d'indométacine durant 6 jours (286).

La cytokine monocyte-chemoattractant protein 1 (MCP-1) n'est pas un biomarqueur de l'inflammation lors du diagnostic de la DEE mais MCP-1 est souvent mesurée dans les études précliniques. Par exemple, une dénutrition protéique de 3 semaines et une entéropathie induisent une augmentation de la production de MCP-1 au niveau du jéjunum chez la souris (11). Nous observons le même profil dans notre modèle avec une augmentation de l'expression en ARNm codant pour MCP-1. Les gavages d'indométacine dans notre modèle impacteraient la sécrétion de MCP-1 puisqu'il a été montré une augmentation de sa sécrétion dans un modèle d'entéropathie induite par une injection sous-cutanée d'indométacine (10mg/kg) (296). Dans cette étude, les souris IL-17 -/- ne développent pas d'entéropathie suggérant que l'indométacine induit l'augmentation de la sécrétion de MCP-1 *via* la sécrétion d'une cytokine pro-inflammatoire, IL-17, par les lymphocytes Th17 et les cellules dendritiques (296).

La lipocaline-2 est une glycoprotéine sécrétée par des neutrophiles (297). Elle a été corrélée positivement avec d'autres biomarqueurs de l'inflammation intestinale reflétant l'activité des neutrophiles (calprotectine, MPO et lactoferrine) dans une étude clinique impliquant des enfants atteints de MAS avec DEE (298). Une étude préclinique a mis en évidence une augmentation de la production de lipocaline-2 dans un modèle de dénutrition induit par un régime pauvre en protéines (2%) durant 2 semaines (299). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation de la production de lipocaline-2.

#### *La fonction de barrière : le microbiote intestinal*

Les enfants atteints de MAS présentent une dysbiose caractérisée par une diminution des taux de bactéries anaérobies comme *Bacteroidaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae* et *Ruminococceae* et une augmentation de bactéries aérobies pathogènes pro-inflammatoires telles qu'*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus* (159). Une diminution drastique de *Methanobrevibacter smithii* a également été détectée à cause de l'oxydation intestinale présente chez les enfants dénutris (159). Le modèle de dénutrition avec DEE induit par un régime pauvre en protéines (7%) et un cocktail bactérien induit une augmentation des *Bacteroidetes* et des Entérobactéries (11). L'augmentation des *Bacteroidetes* a également été observée dans un modèle d'entéropathie induite par un gavage quotidien d'indométacine (5mg/kg) durant 6 jours (286). Quant à notre étude, la combinaison du régime pauvre en protéines et les gavages d'indométacine a permis de développer une augmentation du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* et une diminution de *Bacteroides*. L'augmentation de ce ratio a déjà été observée dans un modèle de dénutrition (300). Parmi les *Firmicutes*, *Faecalibacterium prausnitzii* est diminuée dans notre modèle alors qu'*Akkermancia muciniphila* est augmentée. *F. prausnitzii* et *A. muciniphila* n'ont pas été étudiées dans le cadre de la dénutrition. Chez des patients atteints de la maladie de Crohn, l'abondance de *F. prausnitzii* a été corrélée négativement avec la production de calprotectine fécale (68). Concernant *A. muciniphila*, une diminution de son abondance fécale a été mise en évidence dans un modèle de dénutrition induit par une séparation maternelle chez le souriceau comme chez les souris obèses adultes (65,66). Une augmentation de l'abondance d'*A. muciniphila* a été induite suite à l'administration d'oligofructose, un prébiotique, chez la souris obèse (66). Son abondance est corrélée négativement avec la concentration plasmatique de LPS (66).

#### *Hypothalamus : inflammation et paramètre de régulation de la prise alimentaire.*

La régulation de la prise alimentaire au niveau central est régie par le noyau arqué de l'hypothalamus. Ce noyau se compose de neurones CART (« Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript ») et POMC (« Pro-opiomélanocortine) dont l'activation par l' $\alpha$ -MSH ou CART induit une réponse anorexigène (301). Il se compose également de neurones co-exprimant les facteurs orexigènes neuropeptides Y (NPY) et « agouti related protein » (AgRP). Dans certains cas, une diminution de la prise alimentaire est observée chez les enfants atteints de MAS avec complications médicales. Afin de mieux comprendre les mécanismes du développement de cette diminution de la prise alimentaire, nous avons caractérisé en première approche l'expression relative en ARNm codant pour NPY et POMC au niveau hypothalamique. Dans notre modèle de dénutrition avec DEE, une augmentation de l'expression en ARNm codant pour NPY, neuropeptide orexigène, et du rapport NPY/POMC a été détectée dans l'hypothalamus suggérant un phénomène d'adaptation du modèle sur la régulation centrale de la prise alimentaire. Dans un modèle de dénutrition post-natal, les souris

sevrées ayant eu une restriction alimentaire développent également une augmentation de l'expression en ARNm codant pour NPY s'expliquant par une diminution de la production de leptine, cette dernière étant connue comme inhibiteur de la voie NPY/AgRP (302,303). La leptinémie n'a pas été mesurée dans notre modèle mais des études ont montré une diminution drastique de sa concentration plasmatique dans des modèles de restriction calorique et de dénutrition protéinergique (304). Dans notre étude, nous détectons une augmentation de l'expression en ARNm codant pour TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  dans l'hypothalamus suggérant une augmentation de l'inflammation hypothalamique. L'augmentation de l'expression en ARNm codant pour TNF- $\alpha$  a été mise en évidence dans un modèle gériatrique de dénutrition induite par une restriction calorique (-50%) durant 12 semaines chez le rat (305). Cette augmentation s'expliquerait par une diminution de la sécrétion plasmatique d'insuline dans ce modèle (305). TNF- $\alpha$  a également un rôle dans la diminution de la prise alimentaire dans un modèle murin (306). Une étude montre également que le LPS et le TNF- $\alpha$  bloqueraient la réponse de la voie NPY/AgRP dans le noyau arqué en réponse à une diminution de la glycémie (307). Il serait intéressant dans une prochaine étude d'évaluer la prise alimentaire des souris dénutries avec DEE et de mieux caractériser sa régulation en mesurant l'insulinémie et la leptinémie. Une des limites actuelles est notre difficulté à obtenir des quantités de plasma suffisantes chez les souris dénutries.

## 1.2. Évaluation de la supplémentation du lait F-75 sur la fonction de barrière.

Le lait thérapeutique F-75 est utilisé durant la phase 1 dite de « stabilisation » de l'enfant atteint de MAS avec complications médicales afin de restaurer ses fonctions métaboliques et améliorer son statut clinique avant la phase de transition (2). Le lait thérapeutique F-75 est hypocalorique (75Kcal/100ml), pauvre en protéines (5% de l'énergie totale) et en sodium (<17mg/100ml) et sa composition n'a pas changée depuis ces deux dernières décennies (2,279). Sa formulation en protéines se base sur des études observationnelles de *Picou et al* démontrant l'amélioration de la survie des enfants avec une solution nutritive pauvre en protéines (308). Ces observations ont également été constatées par *Collins et al.* chez des patients adultes dénutris présentant des œdèmes en Somalie (309). Les enfants atteints de MAS présentent également un déséquilibre électrolytique caractérisée par une hypernatrémie intracellulaire (310,311). Le lait thérapeutique F-75 sert également à rétablir l'équilibre électrolytique. En effet, les données de la littérature sur le jeûne ont permis de constater une diminution de l'efficacité de la pompe à sodium (pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) se traduisant par un déséquilibre électrolytique caractérisé par une hyponatrémie et une hyperkaliémie (312). L'apport important en glucides se traduit par une augmentation importante de la glycémie puis de l'insulinémie se traduisant par un déséquilibre électrolytique pouvant induire par exemple un trouble du rythme cardiaque (312). Le F-75 permet de limiter ce phénomène et permet ainsi de réactiver le métabolisme cellulaire et donc de restaurer l'équilibre électrolytique (2).

Dans certains cas, l'efficacité de la prise en charge par le lait thérapeutique F-75 peut être diminuée par une DEE et/ou une diarrhée dont la conséquence est une diminution de l'absorption des nutriments ingérés (9). A partir de ce constat, nous avons décidé d'améliorer le lait thérapeutique F-75 afin de corriger la fonction de barrière intestinale et ainsi améliorer la réabsorption. Durant cette thèse, nous avons supplémenté la formulation du lait thérapeutique F-75 avec un mélange de glutamine (4%) et de leucine (1%). La glutamine présente des effets bénéfiques sur la fonction de barrière intestinale. En effet, une étude a montré que la glutamine induisait une diminution de la perméabilité intestinale et une diminution de l'inflammation dans un modèle de mucite induite par du méthotrexate chez la souris (205) et une amélioration de l'absorption intestinale dans une étude clinique (215). Quant à la leucine, il a été montré chez le porcelet nouveau-né que cet acide aminé branché est un substrat très important dans la synthèse protéique musculaire et est impliqué dans la promotion de son activation en régulant la voie mTOR (224). La leucine promeut également la synthèse protéique intestinale (208) et induit une augmentation de la taille des villosités (226).

### 1.2.1. Quel est l'impact de la supplémentation en glutamine et leucine du lait thérapeutique sur la croissance staturo-pondérale ?

La supplémentation du lait thérapeutique F-75 en glutamine (4%) et en leucine (1%) a été évaluée sur notre modèle de dénutrition avec DEE durant la semaine d'induction de l'entéropathie (de J14 à J21). Afin de mettre en évidence l'effet propre de la combinaison en glutamine et en leucine, deux solutions contrôles ont été évaluées. Nous avons ajouté soit de la maltodextrine (5%) pour la solution isocalorique, soit un mélange d'acides aminés (5%) pour la solution contrôle isoazotée. Dans cette étude, les laits thérapeutiques enrichis en maltodextrine, en acides aminés ou en glutamine/leucine ont induit un gain de poids significatif chez les souris dénutries avec DEE. De manière intéressante, une prise de poids a également été observée dans une étude testant l'effet d'un lait sur la croissance de souris dénutries (313). Le lait supplémenté avec de la maltodextrine ou le mélange glutamine/leucine n'a pas induit d'augmentation de la croissance linéaire alors que le mélange d'acides aminés induit une amélioration de la croissance linéaire caractérisée par une augmentation de la longueur de la queue uniquement comparée aux souris ayant reçu un lait supplémenté en glutamine et en leucine. Dans un modèle de dénutrition chez le porcelet, la supplémentation en leucine induit l'activation de la voie mTOR, voie préférentielle de l'activation de la synthèse protéique musculaire, sans reprise de la croissance (227). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'état de dénutrition était trop important pour que la supplémentation en leucine suffise à rattraper la croissance (227). Cette observation a également été mise en évidence chez des souris dénutries par un régime pauvre en protéines (7%) durant 3 semaines (314). Durant ces 3 semaines, la supplémentation dans l'eau de boisson en alanyl-glutamine n'a pas eu d'effet sur la masse corporelle ou la taille de la queue des souris dénutries (314).

### 1.2.2. Quel est l'impact du lait thérapeutique supplémenté sur la fonction de barrière intestinale

#### *Impact sur la perméabilité intestinale*

Dans l'étude n°2, le modèle de dénutrition avec entéropathie n'a pas développé d'hyperperméabilité intestinale globale. De manière intéressante, ce modèle présente une diminution de l'expression en ARNm codant pour claudine-2, une protéine de jonction serrée, également diminuée dans la première étude (Article n°1). Chez les souris dénutries avec entéropathie ayant reçu du lait thérapeutique supplémenté en glutamine/leucine, l'expression en ARNm codant pour CLDN-2 au niveau du jéjunum est augmentée ce qui suppose une modulation de la barrière intestinale dans ce modèle. Dans la littérature, il a été démontré une augmentation de l'expression en ARNm codant pour CLDN-2 dans un modèle murin de dénutrition avec DEE et qu'elle était plutôt associée à une

augmentation de la perméabilité intestinale globale (11). Néanmoins, l'infection à *Citrobacter rodentium* chez la souris induit une augmentation de l'expression de claudine-2 au niveau du colon associé à une augmentation de la perméabilité intestinale limitée aux petites molécules telles que l'eau et Na<sup>+</sup> (315). En effet, une étude *in vitro* indique que la claudine-2, en plus d'être perméable au Na<sup>+</sup>, est perméable à l'eau (316). De façon différente, des souris CLDN-2<sup>-/-</sup> présentent une réduction de l'absorption du sodium jéjunal (317). Une étude clinique a permis de mettre en évidence une augmentation de l'absorption de l'eau après la prise orale de glutamine lors d'un test d'hypersécrétion induit par la prostaglandine (215). Il serait donc intéressant de mesurer la quantité d'eau présente dans les fèces, et parallèlement mesurer la capacité d'absorption de l'eau dans notre modèle de souris dénutries avec DEE. De plus, la modulation de l'expression protéique et l'étude immunohistochimique des protéines de jonctions serrées permettraient de mieux définir la fonction de barrière.

#### *Impact sur l'inflammation intestinale*

Dans l'étude n°2, nous observons une augmentation significative de la production de calprotectine fécale chez les souris dénutries avec DEE ce qui est en adéquation avec les résultats obtenus dans l'étude n°1. De plus, nous observons une diminution significative de l'expression en ARNm codant TNF- $\alpha$  dans notre modèle ce qui a également été observé par *Maldonado et al.* dans un modèle de dénutrition induite par une restriction calorique chez la souris (313). La supplémentation du lait thérapeutique F-75 en glutamine et en leucine induit l'augmentation de l'expression en ARNm codant pour TNF- $\alpha$  au niveau jéjunal dans notre modèle. Ces résultats ont également été observés dans un modèle de restriction calorique chez la souris ayant reçu un lait fermenté durant la phase de re-nutrition (313). La re-nutrition avec le lait fermenté induit une augmentation des cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-12 (313). La supplémentation en glutamine induit une augmentation de l'expression en ARNm codant pour TNF- $\alpha$  dans l'iléon et non dans le jéjunum de souris normonutries (222).

### 1.3. Effet de la supplémentation du lait thérapeutique en gomme arabique et/ou en levure sélénisés

Dans cette troisième partie, nous avons évalué l'effet de la supplémentation en gomme arabique et en levures sélénisées sur (i) la croissance (pondérale et linéaire) et (ii) la fonction de barrière intestinale (inflammation et perméabilité intestinale). Nous avons également testé leurs effets sur le microbiote caecal et sur les paramètres hypothalamiques tels que l'inflammation (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) et les paramètres de régulation de la prise alimentaire (NPY/POMC). Nous avons choisi la gomme arabique pour ses effets prébiotiques (244,245,255), pro-absorbants (234,318) et anti-inflammatoires (319). Une carence plasmatique en sélénium a été observée chez les enfants atteints de MAS dans plusieurs études (257–260). Chez la souris, la déficience en sélénium induit une augmentation de la virulence à Cocsackie B3 et que cette virulence était associée avec l'augmentation du stress oxydant induite par la diminution de l'activité de la glutathione peroxydase, une sélénoprotéine (261). La supplémentation en sélénium sous sa forme chimique, le sélénite de sodium, induit une diminution de l'inflammation dans un modèle de colite chez la souris (263) et une diminution du stress oxydant chez le rat dénutri (268). Cependant, la biodisponibilité du sélénium dépend de sa forme : les levures sélénisées présentent une meilleure disponibilité *in vitro* comparativement au sélénite de sodium (269). C'est pour cela que nous avons choisi d'évaluer l'impact des levures sélénisées telles que *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure possède plusieurs avantages : elle a un effet (i) antibactérien (270–272) (ii) anti-inflammatoire (273,274) et (iii) induit une diminution de la perméabilité intestinale et du stress oxydant (275).

#### 1.3.1. Impact du lait thérapeutique et de sa supplémentation sur les paramètres de croissance.

Contrairement à l'étude précédente, l'impact du lait thérapeutique sur la fonction de barrière intestinale a pu être évalué seul. Dans un premier temps, le lait thérapeutique et sa supplémentation en gomme arabique et/ou en levures enrichies en sélénium n'a pas eu d'impact sur la croissance staturo-pondérale. Le lait thérapeutique F-75 n'est pas formulé pour la reprise de poids mais pour corriger le métabolisme basal en corrigeant le déséquilibre électrolytique (2,10). Il s'agit donc d'un résultat attendu. Cependant, il n'a pas été possible d'évaluer la quantité de lait consommée pour chaque souris car ces dernières sont réparties cinq par cage. Nous n'avons pas pu déduire la quantité d'énergie consommée. Il serait à l'avenir intéressant de mieux caractériser la prise alimentaire.

### 1.3.2. Impact du lait thérapeutique et de sa supplémentation sur la fonction de barrière intestinale

#### *Impact sur la perméabilité intestinale*

Le lait thérapeutique seul n'a pas modifié la perméabilité intestinale. Chez des souris nouveau-nées ayant reçu une injection intrapéritonéale de LPS (10mg/kg), le traitement par des globules gras du lait induit une amélioration de la fonction de barrière intestinale caractérisée par une augmentation de l'expression de protéines de jonctions serrées telles que ZO-1, occludine et claudine-1 (320). D'autres études montrent que les protéines de lait induisent également une amélioration de la fonction de barrière dans un modèle de septicémie dans un modèle porcin (321). Cette amélioration se traduit par une augmentation de l'expression de claudine-1, de ZO-1 et de l'occludine dans le jéjunum et une amélioration de la perméabilité intestinale (321). Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative sur l'expression protéique de claudine-1 au niveau du jéjunum. Il serait intéressant d'étudier d'autres protéines de jonctions serrées. Enfin, l'adjonction de la gomme arabique et de la levure sélénée n'a pas eu d'impact additionnel sur ces paramètres.

#### *Impact sur l'inflammation intestinale*

Le lait thérapeutique seul permet de diminuer l'inflammation intestinale en diminuant la production de lipocaline-2 au niveau fécal sans pour autant avoir d'impact sur la production de myéloperoxydase ou encore de calprotectine fécale. Une étude a montré l'impact de protéines dérivées du lait sur la diminution de l'inflammation (322). En effet, ces protéines de lait inhibent la voie NF- $\kappa$ B et induisent donc une diminution de la perméabilité intestinale et une restructuration des protéines de jonctions serrées dans un modèle *in vitro* (Caco-2) et dans un modèle de colite chimio-induite chez la souris (322).

La combinaison de gomme arabique et de levures sélénées diminue de manière plus importante la production de calprotectine et de MPO fécale. Cet effet additionnel a également été mis en évidence dans un modèle d'hépatite induite chimiquement chez le rat montrant une diminution plus drastique de l'inflammation hépatique en associant la gomme arabique et la levure sélénée (275).

#### *Impact sur le microbiote caecal*

Dans l'étude n°3, nous avons voulu étudier l'impact du régime alimentaire associé à l'entéropathie sur la composition du microbiote caecal dans une approche préliminaire et évaluer l'effet du lait thérapeutique F-75 enrichi. Dans cette étude, le lait thérapeutique corrige partiellement la dysbiose en diminuant le ratio *Firmicutes/Bacteroides* et en augmentant les *Lactobacillus*. L'augmentation de l'abondance de *Lactobacillus* s'expliquerait par la composition à base de lait de vache du lait



thérapeutique F-75. Il a été montré dans une étude une augmentation de l'abondance du genre *Lactobacillus* chez le rat nourri avec du lait (323). Cependant, nous ne sommes pas en mesure de définir quelle espèce de *Lactobacillus* est en abondance. De manière intéressante, *Lactobacillus plantarum* a montré des effets probiotiques dans un modèle d'endotoxémie induite par *E. coli* entérotoxique chez la souris en induisant une diminution de l'inflammation intestinale (324). De plus, *L. plantarum* permet d'améliorer la croissance de souris dénutries avec un régime pauvre en protéines (294).

Parallèlement, la supplémentation en gomme arabique et en levures sélénées a induit une augmentation de l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* dans le caecum. Dans la littérature, la gomme arabique n'induit pas de fermentation préférentielle de *F. prausnitzii* mais plutôt une augmentation de l'abondance de *Bifidobacterium spp.* et *Lactobacillus spp. in vitro* avec une augmentation de la production d'AGCC, plus particulièrement de l'acétate et du propionate (325). *Kishimoto et al.* a démontré que *Prevotella ruminicola* serait en partie responsable de la fermentation de la GA en propionate (253). Une revue de la littérature a mis en évidence des effets anti-inflammatoires des AGCC dans l'intestin (319).

La GA associée aux levures sélénées dans le lait thérapeutique induit une augmentation de l'abondance de *F. prausnitzii* dans le contenu caecal. Les levures sélénées induisent une augmentation des taux fécaux de *Lactobacillus* chez le cochon après 28 jours de traitement avec en parallèle une diminution des taux fécaux d'*Escherichia coli in vivo* (326). Dans une étude chez le poulet, l'ingestion de nanoparticules de sélénium augmente l'abondance de *Lactobacillus* et de *Faecalibacterium* dans les fèces (327). Quant à la GA, il n'y a pas d'étude montrant d'impact de la GA sur la régulation de l'abondance de *F. prausnitzii* à notre connaissance. Cependant, une étude *in vitro* montre que la GA induit sélectivement une augmentation de l'abondance de *Bifidobacterium spp.* et *Lactobacillus spp* à partir de bactéries en provenance de fèces humaines (325). L'abondance de *F. prausnitzii* a été corrélée négativement avec la production de calprotectine chez des patients atteints de la maladie de Crohn (68) et possède un effet protecteur dans un modèle de colite chimio-induite chez la souris caractérisée par une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse (69). L'effet probiotique de cette bactérie a également été mis en évidence dans un modèle de colite induite par le DSS chez la souris (328). En effet, l'administration de *F. prausnitzii* dans ce modèle induit une diminution de la différenciation des lymphocytes Th17, de la sécrétion d'IL-17 et IL-6 pro-inflammatoires plasmatiques et coliques (328). Un composant de *F. prausnitzii*, « Microbial Anti-inflammatory Molecule » (MAM), serait responsable de l'inhibition de la

voie NF-kB dans des modèles de colite (70). L'administration de *F. Prausnitzii* induit une amélioration de la perméabilité colique dans un modèle SII induit par la séparation maternelle (71).

La gomme arabique seule et/ou en combinaison avec la levure sélénée induit une augmentation de l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* au niveau caecal. À notre connaissance, aucune étude n'a montré d'effet de la gomme arabique ou de levures enrichies ou non en sélénium sur l'abondance de cette bactérie. Cependant, des données montrent que les oligofructoses sont capables d'augmenter l'abondance d'*A. muciniphila* induisant une restauration de l'épaisseur de la couche de mucus du colon et une amélioration de l'endotoxémie induite par un régime riche en lipides dans un modèle de souris obèses (66).

### 1.3.3. Hypothalamus : inflammation et paramètre de régulation de la prise alimentaire.

Le lait thérapeutique seul n'a pas d'effet significatif sur la modulation de l'expression en ARNm codant pour les paramètres pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL1- $\beta$ ) et les paramètres centraux régulateurs de la prise alimentaire (NPY et POMC) dans l'hypothalamus. De plus, aucun impact supplémentaire de la supplémentation en gomme arabique et/ou levures sélénées n'a été mis en évidence.

À notre connaissance, la littérature scientifique ne montre pas d'effet de la gomme arabique sur l'inflammation centrale. De manière intéressante, l'adjonction de gomme arabique en tant qu'émulsifiant à des acides gras polyinsaturés (AGPI) en n-3 de type « acide docosahéxaénoïque » (DHA) permettent une meilleure incorporation du DHA dans les tissus du cerveau, du sang, du foie et du cœur (329). De plus, le DHA est capable d'induire une diminution de la neuroinflammation dans un modèle de lésion cérébrale chez le rat juvénile (330). Le DHA a aussi montré des effets bénéfiques dans des modèles de colites chimio-induites par de l'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS) en diminuant l'inflammation intestinale caractérisée par une diminution de l'expression protéique d'iNOS, de COX-2, d'IL-6 et NF-kB au niveau colique (331,332). Cela pourrait être un nutriment d'intérêt à évaluer dans notre modèle de dénutrition avec entéropathie en le combinant avec de la gomme arabique.

L'ajout de 15mg/L de sélénite de sodium pendant 3 semaines dans l'eau de boisson induit une diminution du stress oxydant mitochondrial engendré par la dénutrition protéique (5% de protéine) dans le cerveau de souris (268). A l'instar des levures, il est possible de tester d'autres molécules

contenant du sélénium. Une étude montre que le prétraitement par gavage de 3-((4-chlorophenyl)selanyl)-1-méthyl-1H-indole (CMI – 20 et 50 mg/kg ), un indole associé à un organosélénium, 30 minutes avant l'injection i.p de LPS (0,8 mg/kg) induit une atténuation du comportement anxieux et une diminution de l'inflammation centrale au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal caractérisée par une diminution de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-4 et IL-6) chez la souris (333).

## Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons développé un modèle de dénutrition avec entéroopathie caractérisé par (i) un retard de croissance staturo-pondéral, (ii) une hyperperméabilité intestinale et (iii) une inflammation intestinale. Une dysbiose, caractérisée par un rapport augmenté de *Firmicutes/Bacteroidetes* a été mise en évidence. De plus, les souris de ce modèle présentent une augmentation de l'expression en ARNm codant pour TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  dans l'hypothalamus suggérant une augmentation de l'inflammation hypothalamique. Les souris dénutries avec entéroopathie présentent une augmentation du rapport NPY/POMC indiquant une altération de la voie régulatrice de la prise alimentaire au niveau hypothalamique. La caractérisation de ce nouveau modèle de dénutrition avec entéroopathie est à approfondir en étudiant par exemple l'expression protéique de certaines protéines de jonctions serrées ou la production de certaines cytokines. L'étude de la composition du microbiote caecal et les paramètres hypothalamiques devraient être mieux caractérisés.

L'effet du lait thérapeutique F-75 a été évalué sur le modèle développé. Seul, il induit une diminution de l'inflammation et un rétablissement du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* caecal. La supplémentation du lait thérapeutique en glutamine et en leucine induit un effet modeste sur les paramètres de croissance et de fonction de barrière intestinale. Nous nous interrogeons sur la dose d'acides aminés utilisée et nous souhaitons à l'avenir tester des concentrations plus importantes. Enfin, l'association de la gomme arabique et des levures sélénisées dans le lait thérapeutique F-75 a un impact additionnel par rapport au lait thérapeutique seul sur la diminution de l'inflammation intestinale, l'augmentation de l'abondance caecale de *Faecalibacterium prausnitzii* et *Akkermansia muciniphila* pouvant avoir des effets bénéfiques sur la fonction de barrière intestinale.

Il serait intéressant d'évaluer l'impact de ce lait sur l'amélioration de l'absorption intestinale. Les enfants atteints de malnutrition aiguë sévère avec dysfonction entérique environnementale présentent une diminution de l'absorption des nutriments. Améliorer cette absorption avec le lait thérapeutique durant la phase de stabilisation permettrait à l'enfant une reprise plus rapide du poids durant la phase 2 du protocole de prise en charge.



## Références

1. Unicef UNCF, (who) WHO, wb] WB. Levels and Trends in Child Malnutrition [Internet]. eSocialSciences; 2018 Jan. Available from: [https://econpapers.repec.org/paper/esswpaper/id\\_3a12424.htm](https://econpapers.repec.org/paper/esswpaper/id_3a12424.htm)
2. World Health Organization. Guideline: Updates on the Management of Severe Acute Malnutrition in Infants and Children. 2013 p. 1–123.
3. Baker SJ. Subclinical intestinal malabsorption in developing countries. *Bull World Health Organ.* 1976;54:485–94.
4. Desai HG, Borkar AV, Pathare SM, Dighe PK, Jeejeebhoy KN. “Flat” jejunal mucosa in the tropics. *Indian J Med Sci.* 1969;23:1–5.
5. Keusch GT. Subclinical malabsorption in Thailand. I. Intestinal absorption in Thai children. *Am J Clin Nutr.* 1972;25:1062–6.
6. Menzies IS, Zuckerman MJ, Nukajam WS, Somasundaram SG, Murphy B, Jenkins AP, Crane RS, Gregory GG. Geography of intestinal permeability and absorption. *Gut.* 1999;44:483–9.
7. Keusch GT, Denno DM, Black RE, Duggan C, Guerrant RL, Lavery JV, Nataro JP, Rosenberg IH, Ryan ET, Tarr PI, et al. Environmental Enteric Dysfunction: Pathogenesis, Diagnosis, and Clinical Consequences. *Clinical Infectious Diseases.* 2014;59:S207–12.
8. Prendergast A, Kelly P. Review : Enteropathies in the Developing World : Neglected Effects on Global Health. 2012;86:756–763.
9. Attia S, Versloot CJ, Voskuil W, van Vliet SJ, Di Giovanni V, Zhang L, Richardson S, Bourdon C, Netea MG, Berkley JA, et al. Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2016;104:1441–9.
10. Burza S, Mahajan R, Marino E, Sunyoto T, Shandilya C, Tabrez M, Kumari K, Mathew P, Jha A, Salse N, et al. Community-based management of severe acute malnutrition in India: new evidence from Bihar. *Am J Clin Nutr.* 2015;101:847–59.
11. Brown EM, Wlodarska M, Willing BP, Vonaesch P, Han J, Reynolds LA, Arrieta M-C, Uhrig M, Scholz R, Partida O, et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. *Nature Communications.* 2015;6:7806.
12. Costa LB, Noronha FJ, Roche JK, Sevilleja JE, Warren CA, Oriá R, Lima A, Guerrant RL. Novel in

vitro and in vivo models and potential new therapeutics to break the vicious cycle of cryptosporidium infection and malnutrition. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205:1464–1471.

13. Bartelt LA, Roche J, Kolling G, Bolick D, Noronha F, Naylor C, Hoffman P, Warren C, Singer S, Guerrant R. Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *J Clin Invest*. 2013;123:2672–84.

14. Karam SM. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci*. 1999;4:D286-298.

15. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 2000;11:4131–42.

16. Jésus P, Ouelaa W, François M, Riachy L, Guérin C, Aziz M, Do Rego JC, Déchelotte P, Fetissov SO, Coëffier M. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clinical Nutrition*. 2013;33:1–8.

17. Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:15064–9.

18. Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuning I, Renes IB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006;131:117–29.

19. Sovran B, Loonen LMP, Lu P, Hugenholtz F, Belzer C, Stolte EH, Boekschoten MV, van Baarlen P, Kleerebezem M, de Vos P, et al. IL-22-STAT3 pathway plays a key role in the maintenance of ileal homeostasis in mice lacking secreted mucus barrier. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21:531–42.

20. Bevins CL. The Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol*. 2004;20:572–80.

21. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:137–61.

22. Pearson C, Uhlig HH, Powrie F. Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. *Trends Immunol*. 2012;33:289–96.

23. Spencer J, Sollid LM. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunology*. 2016;9:1113–24.

24. Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*. 2018;67:1716–25.
25. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59–65.
26. Sundin OH, Mendoza-Ladd A, Zeng M, Diaz-Arévalo D, Morales E, Fagan BM, Ordoñez J, Velez P, Antony N, McCallum RW. The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 9];17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5513040/>
27. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486:222–7.
28. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:4799–807.
29. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312:1355–9.
30. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006;55:205–11.
31. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunencko T, Niazi F, Affourtit J, Egholm M, Henrissat B, Knight R, et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:7503–8.
32. Le Gall G, Noor SO, Ridgway K, Scovell L, Jamieson C, Johnson IT, Colquhoun IJ, Kemsley EK, Narbad A. Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J Proteome Res*. 2011;10:4208–18.
33. Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJF. The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr Obes*. 2017;12 Suppl 1:3–17.
34. Matsuki T, Yahagi K, Mori H, Matsumoto H, Hara T, Tajima S, Ogawa E, Kodama H, Yamamoto K, Yamada T, et al. A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nature Communications*. 2016;7:11939.



35. Mitsuoka T. Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci Microbiota Food Health*. 2014;33:99–116.
36. Vallès Y, Artacho A, Pascual-García A, Ferrús ML, Gosalbes MJ, Abellán JJ, Francino MP. Microbial succession in the gut: directional trends of taxonomic and functional change in a birth cohort of Spanish infants. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004406.
37. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLOS Biology*. 2007;5:e177.
38. Butel M-J. Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect*. 2014;44:1–8.
39. Fujimura KE, Slusher NA, Cabana MD, Lynch SV. Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8:435–54.
40. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13:260–70.
41. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308:1635–8.
42. Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:2263–6.
43. Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrøm K, Rajilic M, Vaughan EE, de Vos WM, Collins MD, Thiel R, Namsolleck P, Blaut M, et al. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:4153–5.
44. Rigottier-Gois L, Bourhis A-G, Gramet G, Rochet V, Doré J. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol Ecol*. 2003;43:237–45.
45. Claire Cherbuy, Muriel Thomas, Phillippe Langella. Le microbiote intestinal: une composante santé qui évolue avec l'âge. *Innovations Agronomiques*. 2013. p. 37–46.
46. Bernalier-Donadille A. [Fermentative metabolism by the human gut microbiota]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010;34 Suppl 1:S16-22.
47. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res*. 2013;69:52–60.

48. Chassard C, Scott KP, Marquet P, Martin JC, Del'homme C, Dapoigny M, Flint HJ, Bernalier-Donadille A. Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;66:496–504.
49. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013;504:446–50.
50. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504:451–5.
51. Gibson SAW, editor. *Human Health: The Contribution of Microorganisms* [Internet]. London: Springer-Verlag; 1994 [cited 2019 Jul 14]. Available from: <https://www.springer.com/gp/book/9781447134459>
52. Parker A, Lawson MAE, Vaux L, Pin C. Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. *Environ Microbiol.* 2018;20:2337–53.
53. Lee SM, Donaldson GP, Mikulski Z, Boyajian S, Ley K, Mazmanian SK. Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature.* 2013;501:426–9.
54. Zheng J, Gänzle MG, Lin XB, Ruan L, Sun M. Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. *Environ Microbiol.* 2015;17:2133–43.
55. Dabard J, Bridonneau C, Phillippe C, Anglade P, Molle D, Nardi M, Ladiré M, Girardin H, Marcille F, Gomez A, et al. Ruminococcin A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:4111–8.
56. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:227–38.
57. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:1469–76.
58. Belzer C, de Vos WM. Microbes inside--from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *ISME J.* 2012;6:1449–58.
59. Santacruz A, Collado MC, García-Valdés L, Segura MT, Martín-Lagos JA, Anjos T, Martí-Romero M, Lopez RM, Florido J, Campoy C, et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr.* 2010;104:83–92.

60. Karlsson CLJ, Onnerfält J, Xu J, Molin G, Ahrné S, Thorngren-Jerneck K. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20:2257–61.
61. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:894–9.
62. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Muccioli GM, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, François P, et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*. 2011;60:2775–86.
63. Hansen CHF, Krych L, Nielsen DS, Vogensen FK, Hansen LH, Sørensen SJ, Buschard K, Hansen AK. Early life treatment with vancomycin propagates *Akkermansia muciniphila* and reduces diabetes incidence in the NOD mouse. *Diabetologia*. 2012;55:2285–94.
64. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490:55–60.
65. Preidis GA, Ajami NJ, Wong MC, Bessard BC, Conner ME, Petrosino JF. Microbial-Derived Metabolites Reflect an Altered Intestinal Microbiota during Catch-Up Growth in Undernourished Neonatal Mice. *J Nutr*. 2016;146:940–8.
66. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:9066–71.
67. Ferreira-Halder CV, Faria AV de S, Andrade SS. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31:643–8.
68. Björkqvist O, Repsilber D, Seifert M, Brislawn C, Jansson J, Engstrand L, Rangel I, Halfvarson J. Alterations in the relative abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* correlate with changes in fecal calprotectin in patients with ileal Crohn’s disease: a longitudinal study. *Scand J Gastroenterol*. 2019;54:577–85.
69. Kawade Y, Sakai M, Okamori M, Morita M, Mizushima K, Ueda T, Takagi T, Naito Y, Itoh Y, Shimada T. Administration of live, but not inactivated, *Faecalibacterium prausnitzii* has a preventive effect on dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Mol Med Rep*. 2019;20:25–32.
70. Breyner NM, Michon C, de Sousa CS, Vilas Boas PB, Chain F, Azevedo VA, Langella P, Chatel JM. Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* Shows a

Protective Effect on DNBS and DSS-Induced Colitis Model in Mice through Inhibition of NF- $\kappa$ B Pathway. *Front Microbiol.* 2017;8:114.

71. Miquel S, Martín R, Lashermes A, Gillet M, Meleine M, Gelot A, Eschalier A, Ardid D, Bermúdez-Humarán LG, Sokol H, et al. Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci Rep* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 9];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4726104/>

72. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018;392:1736–88.

73. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J, Maternal and Child Undernutrition Study Group. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet.* 2008;371:243–60.

74. Trehan I, Goldbach HS, LaGrone LN, Meuli GJ, Wang RJ, Maleta KM, Manary MJ. Antibiotics as part of the management of severe acute malnutrition. *N Engl J Med.* 2013;368:425–35.

75. Rytter MJ, Babirekere-Iriso E, Namusoke H, Christensen VB, Michaelsen KF, Ritz C, Mortensen CG, Mupere E, Friis H. Risk factors for death in children during inpatient treatment of severe acute malnutrition: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2017;105:494–502.

76. Chimhuya S, Kambarami RA, Mujuru H. The levels of malnutrition and risk factors for mortality at Harare Central Hospital-Zimbabwe: an observation study. *Cent Afr J Med.* 2007;53:30–4.

77. Fergusson P, Tomkins A, Kerac M. Improving survival of children with severe acute malnutrition in HIV-prevalent settings. *Int Health.* 2009;1:10–6.

78. Heikens GT, Bunn J, Amadi B, Manary M, Chhagan M, Berkley JA, Rollins N, Kelly P, Adamczick C, Maitland K, et al. Case management of HIV-infected severely malnourished children: challenges in the area of highest prevalence. *Lancet.* 2008;371:1305–7.

79. Saloojee H, De Maayer T, Garenne ML, Kahn K. What's new? Investigating risk factors for severe childhood malnutrition in a high HIV prevalence South African setting. *Scand J Public Health Suppl.* 2007;69:96–106.

80. Trehan I, O'Hare BA, Phiri A, Heikens GT. Challenges in the Management of HIV-Infected Malnourished Children in Sub-Saharan Africa. *AIDS Res Treat.* 2012;2012:790786.

81. Islam MA, Rahman MM, Mahalanabis D. Maternal and socioeconomic factors and the risk of

severe malnutrition in a child: a case-control study. *Eur J Clin Nutr.* 1994;48:416–24.

82. Owor M, Tumwine JK, Kikafunda JK. Socio-economic risk factors for severe protein energy malnutrition among children in Mulago Hospital, Kampala. *East Afr Med J.* 2000;77:471–5.

83. Mishra K, Kumar P, Basu S, Rai K, Aneja S. Risk factors for severe acute malnutrition in children below 5 y of age in India: a case-control study. *Indian J Pediatr.* 2014;81:762–5.

84. Kinyoki DK, Moloney GM, Uthman OA, Kandala N-B, Odundo EO, Noor AM, Berkley JA. Conflict in Somalia: impact on child undernutrition. *BMJ Global Health.* 2017;2:e000262.

85. Tolboom JJ, Ralitapole-Maruping AP, Kabir H, Molatseli P, Anderson J. Severe protein energy malnutrition in Lesotho, death and survival in hospital, clinical findings. *Trop Geogr Med.* 1986;38:351–8.

86. Hoffer LJ, Forse RA. Protein metabolic effects of a prolonged fast and hypocaloric refeeding. *Am J Physiol.* 1990;258:E832-840.

87. Cahill GF, Herrera MG, Morgan AP, Soeldner JS, Steinke J, Levy PL, Reichard GA, Kipnis DM. Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J Clin Invest.* 1966;45:1751–69.

88. Aoki TT. Metabolic adaptations to starvation, semistarvation, and carbohydrate restriction. *Prog Clin Biol Res.* 1981;67:161–77.

89. Medina R, Wing SS, Goldberg AL. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem J.* 1995;307 ( Pt 3):631–7.

90. Wing SS, Haas AL, Goldberg AL. Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochem J.* 1995;307 ( Pt 3):639–45.

91. Cahill GF. Starvation in man. *N Engl J Med.* 1970;282:668–75.

92. Cahill GF, Aoki TT. Starvation and body nitrogen. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1971;82:43–51.

93. Belkhou R, Chereil Y, Heitz A, Robin J-P, Le Maho Y. Energy contribution of proteins and lipids during prolonged fasting in the rat. *Nutrition Research.* 1991;11:365–74.

94. Hasselbalch SG, Knudsen GM, Jakobsen J, Hageman LP, Holm S, Paulson OB. Brain metabolism during short-term starvation in humans. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:125–31.

95. Sitbon G, Mialhe P. [The endocrine pancreas of birds]. *J Physiol (Paris).* 1980;76:5–24.

96. Cohen CY. Energy metabolism in the brain, adaptation towards starvation. *Med Hypotheses*. 1987;24:177–8.
97. Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14:58–74.
98. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*. 2007;6:472–83.
99. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*. 2007;6:458–71.
100. Ding W-X, Yin X-M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*. 2012;393:547–64.
101. Sato T, Ito Y, Nagasawa T. Dietary L-Lysine Suppresses Autophagic Proteolysis and Stimulates Akt/mTOR Signaling in the Skeletal Muscle of Rats Fed a Low-Protein Diet. *J Agric Food Chem*. 2015;63:8192–8.
102. Lewis B, Wittmann W, Krut LH, Hansen JD, Brock JF. Free fatty acid flux through plasma in protein malnutrition of infants. *Clin Sci*. 1966;30:371–5.
103. Badaloo AV, Forrester T, Reid M, Jahoor F. Lipid kinetic differences between children with kwashiorkor and those with marasmus. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:1283–8.
104. Bartz S, Mody A, Hornik C, Bain J, Muehlbauer M, Kiyimba T, Kiboneka E, Stevens R, Bartlett J, St Peter JV, et al. Severe Acute Malnutrition in Childhood: Hormonal and Metabolic Status at Presentation, Response to Treatment, and Predictors of Mortality. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:2128–37.
105. Palacio A, Lopez M, Perez-Bravo F, Monkeberg F, Schlesinger L. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:3040–6.
106. Wharton B. Hypoglycaemia in children with kwashiorkor. *Lancet*. 1970;1:171–3.
107. Bandsma RHJ, Mendel M, Spoelstra MN, Reijngoud D-J, Boer T, Stellaard F, Brabin B, Schellekens R, Senga E, Heikens GT. Mechanisms behind decreased endogenous glucose production in malnourished children. *Pediatr Res*. 2010;68:423–8.
108. Becker DJ, Pimstone BL, Hansen JD, MacHutchon B, Drysdale A. Patterns of insulin response

to glucose in protein-calorie malnutrition. *Am J Clin Nutr.* 1972;25:499–505.

109. Baig HA, Edozien JC. CARBOHYDRATE METABOLISM IN KWASHIORKOR. *The Lancet.* 1965;286:662–5.

110. Spoelstra MN, Mari A, Mendel M, Senga E, van Rheenen P, van Dijk TH, Reijngoud D-J, Zegers RGT, Heikens GT, Bandsma RHJ. Kwashiorkor and marasmus are both associated with impaired glucose clearance related to pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *Metab Clin Exp.* 2012;61:1224–30.

111. Ferreira F, Barbosa HCL, Stoppiglia LF, Delghingaro-Augusto V, Pereira EA, Boschero AC, Carneiro EM. Decreased Insulin Secretion in Islets from Rats Fed a Low Protein Diet Is Associated with a Reduced PKA $\alpha$  Expression. *J Nutr.* 2004;134:63–7.

112. Payne Robinson HM, Seakins A. Fasting Pancreatic Glucagon in Jamaican Children during Malnutrition and Subsequent Recovery. *Pediatric Research.* 1982;16:1011–5.

113. Becker K, Pons-Kühnemann J, Fechner A, Funk M, Gromer S, Gross H-J, Grünert A, Schirmer RH. Effects of antioxidants on glutathione levels and clinical recovery from the malnutrition syndrome kwashiorkor--a pilot study. *Redox Rep.* 2005;10:215–26.

114. Golden MH, Ramdath D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proc Nutr Soc.* 1987;46:53–68.

115. Manary MJ, Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Increased oxidative stress in kwashiorkor. *J Pediatr.* 2000;137:421–4.

116. Jahoor F, Badaloo A, Reid M, Forrester T. Protein metabolism in severe childhood malnutrition. *Ann Trop Paediatr.* 2008;28:87–101.

117. Ciliberto H, Ciliberto M, Briend A, Ashorn P, Bier D, Manary M. Antioxidant supplementation for the prevention of kwashiorkor in Malawian children: randomised, double blind, placebo controlled trial. *BMJ.* 2005;330:1109.

118. Williams CD. A nutritional disease of childhood associated with a maize diet. *Arch Dis Child.* 1933;8:423–33.

119. van Zutphen T, Ciapaite J, Bloks VW, Ackereley C, Gerding A, Jurdzinski A, de Moraes RA, Zhang L, Wolters JC, Bischoff R, et al. Malnutrition-associated liver steatosis and ATP depletion is caused by peroxisomal and mitochondrial dysfunction. *J Hepatol.* 2016;65:1198–208.

120. Waterlow John Conrad, Cameron Gordon Roy. Oxidative phosphorylation in the livers of normal and malnourished human infants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*

Biological Sciences. 1961;155:96–114.

121. Brooks SE, Goldon MH, Taylor E. Hepatic ultrastructure in children with protein-energy malnutrition. *West Indian Med J.* 1992;41:139–45.
122. Webb JG, Kiess MC, Chan-Yan CC. Malnutrition and the heart. *CMAJ.* 1986;135:753–8.
123. Wharton BA, Howells GR, McCance RA. CARDIAC FAILURE IN KWASHIORKOR. *The Lancet.* 1967;290:384–7.
124. Gruber C, Nink N, Nikam S, Magdowski G, Kripp G, Voswinckel R, Mühlfeld C. Myocardial remodelling in left ventricular atrophy induced by caloric restriction. *J Anat.* 2012;220:179–85.
125. Fabiansen C, Lykke M, Hother A-L, Koch J, Nielsen OB, Hunter I, Goetze JP, Friis H, Thymann T. Cardiac Dysfunction in a Porcine Model of Pediatric Malnutrition. *PLoS ONE.* 2015;10:e0140472.
126. Dimiati H, Wahab AS, Juffrie M, Julia M, Gani BA. Study of NT-proBNP and Hs-Troponin I biomarkers for early detection of children’s heart function of proteinenergy malnutrition. *Pediatr Rep.* 2019;11:7997.
127. Kerpel-Fronius E. The pathophysiology of infantile malnutrition; protein-energy malnutrition and failure to thrive. 1983 [cited 2019 Jul 14]; Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015043818>
128. Klahr S, Alleyne GA. Effects of chronic protein-calorie malnutrition on the kidney. *Kidney Int.* 1973;3:129–41.
129. Atalabi OM, Lagunju IA, Tongo OO, Akinyinka OO. Cranial magnetic resonance imaging findings in kwashiorkor. *International Journal of Neuroscience.* 2010;120:23–7.
130. Gunston GD, Burkimsher D, Malan H, Sive AA. Reversible cerebral shrinkage in kwashiorkor: an MRI study. *Arch Dis Child.* 1992;67:1030–2.
131. Grantham-McGregor S, Powell C, Walker S, Chang S, Fletcher P. The long-term follow-up of severely malnourished children who participated in an intervention program. *Child Dev.* 1994;65:428–39.
132. Grantham-McGregor S, Cheung YB, Cueto S, Glewwe P, Richter L, Strupp B, International Child Development Steering Group. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. *Lancet.* 2007;369:60–70.
133. Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, Carter JA, International



Child Development Steering Group. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet*. 2007;369:145–57.

134. Rytter MJH, Kolte L, Briend A, Friis H, Christensen VB. The immune system in children with malnutrition—a systematic review. *PLoS ONE*. 2014;9:e105017.

135. Naylor C, Petri WA. Leptin Regulation of Immune Responses. *Trends Mol Med*. 2016;22:88–98.

136. Hoang T, Agger EM, Cassidy JP, Christensen JP, Andersen P. Protein energy malnutrition during vaccination has limited influence on vaccine efficacy but abolishes immunity if administered during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*. 2015;83:2118–26.

137. Saucillo DC, Gerriets VA, Sheng J, Rathmell JC, Maciver NJ. Leptin metabolically licenses T cells for activation to link nutrition and immunity. *J Immunol*. 2014;192:136–44.

138. Kosek MN, MAL-ED Network Investigators. Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. *EBioMedicine*. 2017;18:109–17.

139. Vonaesch P, Morien E, Andrianonimiadana L, Sanke H, Mbecko J-R, Huus KE, Naharimanananirina T, Gondje BP, Nigatoloum SN, Vondo SS, et al. Stunted childhood growth is associated with decompartmentalization of the gastrointestinal tract and overgrowth of oropharyngeal taxa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115:E8489–98.

140. Ahmed T, Auble D, Berkley JA, Black R, Ahern PP, Hossain M, Hsieh A, Ireen S, Arabi M, Gordon JI. An evolving perspective about the origins of childhood undernutrition and nutritional interventions that includes the gut microbiome. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1332:22–38.

141. Assa A, Vong L, Pinnell LJ, Avitzur N, Johnson-Henry KC, Sherman PM. Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation. *J Infect Dis*. 2014;210:1296–305.

142. Trehan I, Kelly P, Shaikh N, Manary MJ. New insights into environmental enteric dysfunction. *Archives of Disease in Childhood*. 2016;101:741–4.

143. Campbell DI, Murch SH, Elia M, Sullivan PB, Sanyang MS, Jobarteh B, Lunn PG. Chronic T Cell-Mediated Enteropathy in Rural West African Children: Relationship with Nutritional Status and Small Bowel Function. *Pediatric Research*. 2003;54:306–11.

144. Lindenbaum J, Alam AK, Kent TH. Subclinical small-intestinal disease in East Pakistan. *Br Med J*. 1966;2:1616–9.

145. Korpe PS, Petri WA. Environmental enteropathy: Critical implications of a poorly understood condition. *Trends in Molecular Medicine*. 2012;18:328–336.
146. Lunn PG, Northrop-Clewes CA, Downes RM. Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants. *Lancet*. 1991;338:907–10.
147. Jiang NM, Tofail F, Moonah SN, Scharf RJ, Taniuchi M, Ma JZ, Hamadani JD, Gurley ES, Houpt ER, Azziz-Baumgartner E, et al. Febrile illness and pro-inflammatory cytokines are associated with lower neurodevelopmental scores in Bangladeshi infants living in poverty. *BMC Pediatr*. 2014;14:50.
148. Naylor C, Lu M, Haque R, Mondal D, Buonomo E, Nayak U, Mychaleckyj JC, Kirkpatrick B, Colgate R, Carmolli M, et al. Environmental Enteropathy, Oral Vaccine Failure and Growth Faltering in Infants in Bangladesh. *EBioMedicine*. 2015;2:1759–1766.
149. Lindenbaum J, Gerson CD, Kent TH. Recovery of small-intestinal structure and function after residence in the tropics. I. Studies in Peace Corps volunteers. *Ann Intern Med*. 1971;74:218–22.
150. Gerson CD, Kent TH, Saha JR, Siddiqi N, Lindenbaum J. Recovery of small-intestinal structure and function after residence in the tropics. II. Studies in Indians and Pakistanis living in New York City. *Ann Intern Med*. 1971;75:41–8.
151. Campbell DI, Elia M, Lunn PG. Growth faltering in rural Gambian infants is associated with impaired small intestinal barrier function, leading to endotoxemia and systemic inflammation. *J Nutr*. 2003;133:1332–8.
152. Campbell DI, McPhail G, Lunn PG, Elia M, Jeffries DJ. Intestinal inflammation measured by fecal neopterin in Gambian children with enteropathy: association with growth failure, *Giardia lamblia*, and intestinal permeability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39:153–7.
153. Goto K, Chew F, Torún B, Peerson J, Brown K. Epidemiology of Altered Intestinal Permeability to Lactulose and Mannitol in Guatemalan Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 1999;28:282–90.
154. Goto R, Panter-Brick C, Northrop-Clewes CA, Manahdhar R, Tuladhar NR. Poor intestinal permeability in mildly stunted Nepali children: associations with weaning practices and *Giardia lamblia* infection. *Br J Nutr*. 2002;88:141–9.
155. Weisz AJ, Manary MJ, Stephenson K, Agapova S, Manary FG, Thakwalakwa C, Shulman RJ, Manary MJ. Abnormal gut integrity is associated with reduced linear growth in rural Malawian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55:747–50.

156. Lin A, Arnold BF, Afreen S, Goto R, Huda TMN, Haque R, Raqib R, Unicomb L, Ahmed T, Colford JM, et al. Household environmental conditions are associated with enteropathy and impaired growth in rural Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89:130–7.
157. Donowitz JR, Haque R, Kirkpatrick BD, Alam M, Lu M, Kabir M, Kakon SH, Islam BZ, Afreen S, Musa A, et al. Small Intestine Bacterial Overgrowth and Environmental Enteropathy in Bangladeshi Children. *MBio.* 2016;7:e02102-02115.
158. Subramanian S, Huq S, Yatsunenکو T, Haque R, Mahfuz M, Alam MA, Benezra A, DeStefano J, Meier MF, Muegge BD, et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature.* 2014;510:417–21.
159. Million M, Tidjani Alou M, Khelaifia S, Bachar D, Lagier J-C, Dione N, Brah S, Hugon P, Lombard V, Armougom F, et al. Increased Gut Redox and Depletion of Anaerobic and Methanogenic Prokaryotes in Severe Acute Malnutrition. *Scientific Reports.* 2016;6:26051.
160. Pham T-P-T, Tidjani Alou M, Bachar D, Levasseur A, Brah S, Alhousseini D, Sokhna C, Diallo A, Wieringa F, Million M, et al. Gut Microbiota Alteration is Characterized by a Proteobacteria and Fusobacteria Bloom in Kwashiorkor and a Bacteroidetes Paucity in Marasmus. *Sci Rep.* 2019;9:9084.
161. Manokas T, Fromkes JJ, Sundaram U. Effect of chronic inflammation on ileal short-chain fatty acid/bicarbonate exchange. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278:G585-590.
162. Kau AL, Planer JD, Liu J, Rao S, Yatsunenکو T, Trehan I, Manary MJ, Liu T-C, Stappenbeck TS, Maleta KM, et al. Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Sci Transl Med.* 2015;7:276ra24.
163. George CM, Burrowes V, Perin J, Oldja L, Biswas S, Sack D, Ahmed S, Haque R, Bhuiyan NA, Parvin T, et al. Enteric Infections in Young Children are Associated with Environmental Enteropathy and Impaired Growth. *Trop Med Int Health.* 2018;23:26–33.
164. Rogawski ET, Guerrant RL, Havt A, Lima IFN, Medeiros PHQS, Seidman JC, McCormick BJJ, Babji S, Hariraju D, Bodhidatta L, et al. Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11:e0005798.
165. Steiner TS, Lima AA, Nataro JP, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *The Journal of infectious diseases.* 1998;177:88–96.
166. Checkley W, Buckley G, Gilman RH, Assis AM, Guerrant RL, Morris SS, Mølbak K, Valentiner-Branth P, Lanata CF, Black RE, et al. Multi-country analysis of the effects of diarrhoea on childhood

stunting. *Int J Epidemiol*. 2008;37:816–30.

167. Bhutta ZA, Ahmed T, Black RE, Cousens S, Dewey K, Giugliani E, Haider BA, Kirkwood B, Morris SS, Sachdev HPS, et al. What works? Interventions for maternal and child undernutrition and survival. *Lancet*. 2008;371:417–40.

168. Snyder JD, Merson MH. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull World Health Organ*. 1982;60:605–13.

169. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Rudan I, Campbell H, Cibulskis R, Li M, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet*. 2012;379:2151–2161.

170. Dewey KG, Adu-Afarwuah S. Systematic review of the efficacy and effectiveness of complementary feeding interventions in developing countries. *Matern Child Nutr*. 2008;4 Suppl 1:24–85.

171. Humphrey JH. Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing. *The Lancet*. 2009;374:1032–5.

172. Grassly NC, Prahara J, Babji S, Kaliappan SP, Giri S, Venugopal S, Parker EPK, Abraham A, Muliylil J, Doss S, et al. The effect of azithromycin on the immunogenicity of oral poliovirus vaccine: a double-blind randomised placebo-controlled trial in seronegative Indian infants. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:905–14.

173. Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*. 2002;359:564–71.

174. Guerrant DI, Moore SR, Lima AA, Patrick PD, Schorling JB, Guerrant RL. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61:707–13.

175. Niehaus MD, Moore SR, Patrick PD, Derr LL, Lorntz B, Lima AA, Guerrant RL. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:590–3.

176. Mendez MA, Adair LS. Severity and timing of stunting in the first two years of life affect performance on cognitive tests in late childhood. *J Nutr*. 1999;129:1555–62.

177. Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun*. 2010;24:881–97.
178. Dinel A-L, Joffre C, Trifilieff P, Aubert A, Foury A, Le Ruyet P, Layé S. Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *J Neuroinflammation*. 2014;11:155.
179. McKlveen JM, Myers B, Flak JN, Bundzikova J, Solomon MB, Seroogy KB, Herman JP. Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion. *Biol Psychiatry*. 2013;74:672–9.
180. Amadi B, Besa E, Zyambo K, Kaonga P, Louis-Auguste J, Chandwe K, Tarr PI, Denno DM, Nataro JP, Faubion W, et al. Impaired Barrier Function and Autoantibody Generation in Malnutrition Enteropathy in Zambia. *EBioMedicine*. 2017;22:191–9.
181. Farràs M, Chandwe K, Mayneris-Perxachs J, Amadi B, Louis-Auguste J, Besa E, Zyambo K, Guerrant R, Kelly P, Swann JR. Characterizing the metabolic phenotype of intestinal villus blunting in Zambian children with severe acute malnutrition and persistent diarrhea. *PLoS ONE*. 2018;13:e0192092.
182. Denno DM, Tarr PI, Nataro JP. Environmental Enteric Dysfunction: A Case Definition for Intervention Trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97:1643–6.
183. Kelly P, Besa E, Zyambo K, Louis-Auguste J, Lees J, Banda T, Soko R, Banda R, Amadi B, Watson A. Endomicroscopic and Transcriptomic Analysis of Impaired Barrier Function and Malabsorption in Environmental Enteropathy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004600.
184. Keusch GT, Rosenberg IH, Denno DM, Duggan C, Guerrant RL, Lavery JV, Tarr PI, Ward HD, Black RE, Nataro JP, et al. Implications of acquired environmental enteric dysfunction for growth and stunting in infants and children living in low- and middle-income countries. *Food Nutr Bull*. 2013;34:357–64.
185. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology*. 1995;108:1566–81.
186. Ford RP, Menzies IS, Phillips AD, Walker-Smith JA, Turner MW. Intestinal sugar permeability: relationship to diarrhoeal disease and small bowel morphology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1985;4:568–74.
187. Nathavitharana KA, Lloyd DR, Raafat F, Brown GA, McNeish AS. Urinary mannitol: lactulose excretion ratios and jejunal mucosal structure. *Arch Dis Child*. 1988;63:1054–9.

188. Johnston SD, Smye M, Watson RG, McMillan SA, Trimble ER, Love AH. Lactulose-mannitol intestinal permeability test: a useful screening test for adult coeliac disease. *Ann Clin Biochem.* 2000;37 ( Pt 4):512–9.
189. Menzies IS. Absorption of Intact Oligosaccharide in Health and Disease. *Biochemical Society Transactions.* 1974;2:1042–7.
190. Lee GO, Kosek P, Lima AAM, Singh R, Yori PP, Olortegui MP, Lamsam JL, Oliveira DB, Guerrant RL, Kosek M. Lactulose: mannitol diagnostic test by HPLC and LC-MSMS platforms: considerations for field studies of intestinal barrier function and environmental enteropathy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59:544–50.
191. Crossley JR, Elliott RB. Simple method for diagnosing protein-losing enteropathies. *Br Med J.* 1977;1:428–9.
192. Kosek M, Haque R, Lima A, Babji S, Shrestha S, Qureshi S, Amidou S, Mduma E, Lee G, Yori PP, et al. Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88:390–6.
193. Bennish ML, Salam MA, Wahed MA. Enteric protein loss during shigellosis. *Am J Gastroenterol.* 1993;88:53–7.
194. Papadia C, Sherwood RA, Kalantzis C, Wallis K, Volta U, Fiorini E, Forbes A. Plasma citrulline concentration: A reliable marker of small bowel absorptive capacity independent of intestinal inflammation. *American Journal of Gastroenterology.* 2007;102:1474–1482.
195. Crenn P, Hanachi M, Neveux N, Cynober L. Circulating citrulline levels: a biomarker for intestinal functionality assessment. *Annales de Biologie Clinique.* 2011;69:513–21.
196. McDonald CM, Manji KP, Gosselin K, Tran H, Liu E, Kisenge R, Aboud S, Fawzi WW, Gewirtz AT, Duggan CP. Elevations in serum anti-flagellin and anti-LPS Igs are related to growth faltering in young Tanzanian children. *Am J Clin Nutr.* 2016;103:1548–54.
197. Petri WA, Naylor C, Haque R. Environmental enteropathy and malnutrition: do we know enough to intervene? *BMC Medicine* [Internet]. 2014 [cited 2018 May 29];12. Available from: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-014-0187-1>
198. Kapel N, Campeotto F, Kalach N, Baldassare M, Butel M-J, Dupont C. Faecal calprotectin in term and preterm neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51:542–7.
199. Zhang L, Voskuijl W, Mouzaki M, Groen AK, Alexander J, Bourdon C, Wang A, Versloot CJ, Di

Giovanni V, Wanders RJA, et al. Impaired Bile Acid Homeostasis in Children with Severe Acute Malnutrition. *PLoS ONE*. 2016;11:e0155143.

200. Williams JG, Hughes LE, Hallett MB. Toxic oxygen metabolite production by circulating phagocytic cells in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1990;31:187–93.

201. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984;87:1344–50.

202. Weissmann G, Smolen JE, Korchak HM. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N Engl J Med*. 1980;303:27–34.

203. Boukhattala N, Claeysens S, Bensifi M, Maurer B, Abed J, Lavoinne A, Déchelotte P, Coëffier M. Effects of essential amino acids or glutamine deprivation on intestinal permeability and protein synthesis in HCT-8 cells: involvement of GCN2 and mTOR pathways. *Amino Acids*. 2012;42:375–83.

204. Bertrand J, Ghouzali I, Guérin C, Bôle-Feysot C, Gouteux M, Déchelotte P, Ducrotté P, Coëffier M. Glutamine Restores Tight Junction Protein Claudin-1 Expression in Colonic Mucosa of Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2015;1–7.

205. Beutheu S, Ouelaa W, Guérin C, Belmonte L, Aziz M, Tennoune N, Bôle-Feysot C, Galas L, Déchelotte P, Coëffier M. Glutamine supplementation, but not combined glutamine and arginine supplementation, improves gut barrier function during chemotherapy-induced intestinal mucositis in rats. *Clinical Nutrition*. 2014;33:694–701.

206. Belmonte L, Coëffier M, Le Pessot F, Miralles-Barrachina O, Hiron M, Leplingard A, Lemeland J-F, Hecketsweiler B, Daveau M, Ducrotté P, et al. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. *World J Gastroenterol*. 2007;13:2833–2840.

207. Hubert-Buron A, Leblond J, Jacquot A, Ducrotte P, Déchelotte P, Coëffier M. Biochemical , Molecular , and Genetic Mechanisms Glutamine Pretreatment Reduces IL-8 Production in Human Intestinal Epithelial Cells by Limiting I k B a Ubiquitination. *The Journal of nutrition*. 2006;1461–1465.

208. Rhoads JM, Wu G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids*. 2009;37:111–122.

209. Hou Y-C, Chu C-C, Ko T-L, Yeh C-L, Yeh S-L. Effects of alanyl-glutamine dipeptide on the expression of colon-inflammatory mediators during the recovery phase of colitis induced by dextran

sulfate sodium. *Eur J Nutr.* 2013;52:1089–98.

210. Coëffier M, Miralles-barrachina O, Pessot FL, Lalaude O, Daveau M, Lavoine A, Lerebours E, Déchelotte P. INFLUENCE OF GLUTAMINE ON CYTOKINE PRODUCTION BY HUMAN GUT IN Coëffier, M., Miralles-barrachina, O., Pessot, F. Le, Lalaude, O., Daveau, M., Lavoine, A., \ldots Déchelotte, P. (2001). INFLUENCE OF GLUTAMINE ON CYTOKINE PRODUCTION BY HUMAN GUT IN VITRO. *Cytoki. Cytokine.* 2001;13:148–154.

211. Coëffier M, Marion R, Ducrotte P, Déchelotte P. Modulating effect of glutamine on IL-1  $\beta$ -induced cytokine production by human gut. *Clinical Nutrition.* 2003;22:407–413.

212. Mbodji K, Torre S, Haas V, Déchelotte P, Marion-Letellier R. Alanyl-glutamine restores maternal deprivation-induced TLR4 levels in a rat neonatal model. *Clinical Nutrition.* 2011;30:672–677.

213. Leclaire S, Hassan A, Marion-letellier R, Antonietti M, Savoye G, Bôle-Feysot C, Lerebours E, Ducrotte P, Déchelotte P, Coëffier M. Combined Glutamine and Arginine Decrease Proinflammatory Cytokine Production by Biopsies from Crohn ' s Patients in Association with Changes in Nuclear Factor- k B and p38. *The Journal of nutrition.* 2008;2481–2486.

214. Liboni KC, Li N, Scumpia PO, Neu J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *J Nutr.* 2005;135:245–51.

215. Coëffier M, Hecketsweiler B, Hecketsweiler P, Déchelotte P. Effect of glutamine on water and sodium absorption in human jejunum at baseline and during PGE1-induced secretion. *J Appl Physiol.* 2005;98:2163–8.

216. van Loon FP, Banik AK, Nath SK, Patra FC, Wahed MA, Darmaun D, Desjeux JF, Mahalanabis D. The effect of L-glutamine on salt and water absorption: a jejunal perfusion study in cholera in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996;8:443–8.

217. Silva AC, Santos-Neto MS, Soares AM, Fonteles MC, Guerrant RL, Lima AA. Efficacy of a glutamine-based oral rehydration solution on the electrolyte and water absorption in a rabbit model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998;26:513–9.

218. Déchelotte P, Darmaun D, Rongier M, Desjeux JF. Glutamine transport in isolated rabbit ileal epithelium. *Gastroenterol Clin Biol.* 1989;13:816–21.

219. Nath SK, Dechelotte P, Darmaun D, Gotteland M, Rongier M, Desjeux JF. [15N]- and [14C]glutamine fluxes across rabbit ileum in experimental bacterial diarrhea. *Am J Physiol.* 1992;262:G312-318.



220. Coëffier M, Claeysens S, Bôle-Feysot C, Guérin C, Maurer B, Lecleire S, Lavoine A, Donnadiou N, Cailleux A-F, Déchelotte P. Enteral delivery of proteins stimulates protein synthesis in human duodenal mucosa in the fed state through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Am J Clin Nutr.* 2013;97:286–94.
221. Le Bacquer O, Nazih H, Blottière H, Meynial-Denis D, Laboisse C, Darmaun D. Effects of glutamine deprivation on protein synthesis in a model of human enterocytes in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281:G1340-1347.
222. Ren W, Duan J, Yin J, Liu G. Dietary l - glutamine supplementation modulates microbial community and activates innate immunity in the mouse intestine. *Amino Acids.* 2014;2403–2413.
223. de Souza AZZ, Zambom AZ, Abboud KY, Reis SK, Tannihão F, Guadagnini D, Saad MJA, Prada PO. Oral supplementation with L-glutamine alters gut microbiota of obese and overweight adults: A pilot study. *Nutrition.* 2015;31:884–9.
224. Columbus DA, Fiorotto ML, Davis TA. Leucine is a major regulator of muscle protein synthesis in neonates. *Amino Acids.* 2015;47:259–70.
225. Hernandez-García AD, Columbus DA, Manjarín R, Nguyen HV, Suryawan A, Orellana RA, Davis TA. Leucine supplementation stimulates protein synthesis and reduces degradation signal activation in muscle of newborn pigs during acute endotoxemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311:E791–801.
226. Sun Y, Wu Z, Li W, Zhang C, Sun K, Ji Y, Wang B, Jiao N, He B, Wang W, et al. Dietary L-leucine supplementation enhances intestinal development in suckling piglets. *Amino Acids.* 2015;47:1517–25.
227. Manjarín R, Columbus DA, Solis J, Hernandez-García AD, Suryawan A, Nguyen HV, McGuckin MM, Jimenez RT, Fiorotto ML, Davis TA. Short- and long-term effects of leucine and branched-chain amino acid supplementation of a protein- and energy-reduced diet on muscle protein metabolism in neonatal pigs. *Amino Acids.* 2018;50:943–59.
228. Gao X, Tian F, Wang X, Zhao J, Wan X, Zhang L, Wu C, Li N, Li J. Leucine Supplementation Improves Acquired Growth Hormone Resistance in Rats with Protein-Energy Malnutrition. *Plos One.* 2015;10:e0125023.
229. Yin Y, Yao K, Liu Z, Gong M, Ruan Z, Deng D, Tan B, Liu Z, Wu G. Supplementing L-leucine to a low-protein diet increases tissue protein synthesis in weanling pigs. *Amino Acids.* 2010;39:1477–86.
230. Zhang S, Qiao S, Ren M, Zeng X, Ma X, Wu Z, Thacker P, Wu G. Supplementation with

branched-chain amino acids to a low-protein diet regulates intestinal expression of amino acid and peptide transporters in weanling pigs. *Amino Acids*. 2013;45:1191–205.

231. Rhoads JM, Wu G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids*. 2009;37:111–122.

232. Phillips GO. Acacia gum (Gum Arabic): a nutritional fibre; metabolism and calorific value. *Food Addit Contam*. 1998;15:251–64.

233. Codipilly CN, Teichberg S, Wapnir RA, Codipilly CN, Teichberg S, Wapnir RA, Perinatal N, Children S, Feinstein T. Enhancement of Absorption by Gum Arabic in a Model of Gastrointestinal Dysfunction. *Journal of the American College of Nutrition*. 2006;25:307–312.

234. Wapnir RA, Wingertzahn MA, Moyse J, Teichberg S. Gum Arabic Promotes Rat Jejunal Sodium and Water Absorption From Oral Rehydration Solutions in Two Models of Diarrhea. *Gastroenterology*. 1997;112:1979–1985.

235. Wapnir RA, Teichberg S, Go JT, Wingertzahn MA, Harper RG. Oral rehydration solutions: enhanced sodium absorption with gum arabic. *J Am Coll Nutr*. 1996;15:377–82.

236. Teichberg S, Wingertzahn MA, Moyse J, Wapnir RA. Effect of Gum Arabic in an Oral Rehydration. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 1999;29:411–417.

237. Teichberg S, Wingertzahn MA, Moyse J, Wapnir RA. Effect of gum arabic in an oral rehydration solution on recovery from diarrhea in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;29:411–7.

238. Turvill JL, Wapnir RA, Wingertzahn MA, Teichberg S, Farthing MJ. Cholera toxin-induced secretion in rats is reduced by a soluble fiber, gum arabic. *Dig Dis Sci*. 2000;45:946–51.

239. Rehman KU, Wingertzahn MA, Teichberg S, Harper RG, Wapnir RA. Gum Arabic ( GA ) Modifies Paracellular Water and Electrolyte Transport in the Small Intestine. 2003;48:755–760.

240. Wingertzahn MA, Teichberg S, Wapnir RA. Stimulation of non-sodium-dependent water, electrolyte, and glucose transport in rat small intestine by gum arabic. *Dig Dis Sci*. 2001;46:1105–12.

241. Rehman K, Wingertzahn MA, Harper RG, Wapnir RA. Proabsorptive action of gum arabic: regulation of nitric oxide metabolism in the basolateral potassium channel of the small intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001;32:529–33.

242. Rehman KU, Codipilly CN, Wapnir RA. Modulation of small intestinal nitric oxide synthase by gum arabic. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:895–901.

243. MOURAD F, TURVILL J, FARTHING M. Role of nitric oxide in intestinal water and electrolyte transport. *Gut*. 1999;44:143–7.
244. Wyatt GM, Bayliss CE, Holcroft JD. A change in human faecal flora in response to inclusion of gum arabic in the diet. *Br J Nutr*. 1986;55:261–6.
245. Cherbut C, Michel C, Raison V, Kravtchenko T, Severine M. Acacia Gum is a Bifidogenic Dietary Fibre with High Digestive Tolerance in Healthy Humans. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2003;15:43–50.
246. Ross AHM, Eastwood MA, Brydon WG, Busuttil A, McKay LF, Anderson DMW. A study of the effects of dietary gum arabic in the rat. *British Journal of Nutrition*. 1984;51:47–56.
247. Walter DJ, Eastwood MA, Brydon WG, Elton RA. Fermentation of wheat bran and gum arabic in rats fed on an elemental diet. *Br J Nutr*. 1988;60:225–32.
248. May T, Mackie RI, Fahey GC, Cremin JC, Garleb KA. Effect of Fiber Source on Short-Chain Fatty Acid Production and on the Growth and Toxin Production by *Clostridium difficile*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1994;29:916–22.
249. Younes H, Garleb K, Behr S, Rémésy C, Demigné C. Fermentable Fibers or Oligosaccharides Reduce Urinary Nitrogen Excretion by Increasing Urea Disposal in the Rat Cecum. *J Nutr*. 1995;125:1010–6.
250. Howard MD, Gordon DT, Garleb KA, Kerley MS. Dietary Fructooligosaccharide, Xylooligosaccharide and Gum Arabic Have Variable Effects on Cecal and Colonic Microbiota and Epithelial Cell Proliferation in Mice and Rats. *J Nutr*. 1995;125:2604–9.
251. Tulung B, Rémésy C, Demigné C. Specific Effects of Guar Gum or Gum Arabic on Adaptation of Cecal Digestion to High Fiber Diets in the Rat. *J Nutr*. 1987;117:1556–61.
252. Annison G, Trimble RP, Topping DL. Feeding Australian Acacia Gums and Gum Arabic Leads to Non-Starch Polysaccharide Accumulation in the Cecum of Rats. *J Nutr*. 1995;125:283–92.
253. Kishimoto A, Ushida K, Phillips GO, Ogasawara T, Sasaki Y. Identification of intestinal bacteria responsible for fermentation of gum arabic in pig model. *Curr Microbiol*. 2006;53:173–7.
254. Benno Y, Endo K, Mizutani T, Namba Y, Komori T, Mitsuoka T. Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55:1100–5.
255. Ballal A, Bobbala D, Qadri SM, Föller M, Kempe D, Nasir O, Saeed A, Lang F. Anti-malarial effect of gum arabic. *Malaria Journal*. 2011;10:139.

256. Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol.* 2002;22:3565–76.
257. Mathias PM, Jackson AA. Selenium deficiency in kwashiorkor. *Lancet.* 1982;1:1312–3.
258. Sempértegui F, Estrella B, Vallejo W, Tapia L, Herrera D, Moscoso F, Cerón G, Griffiths JK, Hamer DH. Selenium serum concentrations in malnourished Ecuadorian children: a case-control study. *Int J Vitam Nutr Res.* 2003;73:181–6.
259. Levine RJ, Olson RE. Blood selenium in Thai children with protein-calorie malnutrition. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1970;134:1030–4.
260. Salih MA, Mohamed EF, Galgan V, Jones B, Helsing K, Bani IA, Alasha E. Selenium in malnourished Sudanese children: status and interaction with clinical features. *Ann Nutr Metab.* 1994;38:68–74.
261. Beck MA. Increased virulence of coxsackievirus B3 in mice due to vitamin E or selenium deficiency. *J Nutr.* 1997;127:966S-970S.
262. Beck MA. Selenium and vitamin E status: impact on viral pathogenicity. *J Nutr.* 2007;137:1338–40.
263. Kaushal N, Kudva AK, Patterson AD, Chiaro C, Kennett MJ, Desai D, Amin S, Carlson BA, Cantorna MT, Prabhu KS. Crucial role of macrophage selenoproteins in experimental colitis. *J Immunol.* 2014;193:3683–92.
264. Gandhi UH, Kaushal N, Ravindra KC, Hegde S, Nelson SM, Narayan V, Vunta H, Paulson RF, Prabhu KS. Selenoprotein-dependent up-regulation of hematopoietic prostaglandin D2 synthase in macrophages is mediated through the activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma. *J Biol Chem.* 2011;286:27471–82.
265. Narayan V, Ravindra KC, Liao C, Kaushal N, Carlson BA, Prabhu KS. Epigenetic regulation of inflammatory gene expression in macrophages by selenium. *J Nutr Biochem.* 2015;26:138–45.
266. Ravindra KC, Narayan V, Lushington GH, Peterson BR, Prabhu KS. Targeting of histone acetyltransferase p300 by cyclopentenone prostaglandin  $\Delta(12)$ -PGJ(2) through covalent binding to Cys(1438). *Chem Res Toxicol.* 2012;25:337–47.
267. Hiller F, Oldorff L, Besselt K, Kipp AP. Differential Acute Effects of Selenomethionine and Sodium Selenite on the Severity of Colitis. *Nutrients.* 2015;7:2687–706.
268. Adebayo OL, Adenuga GA, Sandhir R. Selenium and zinc protect brain mitochondrial

antioxidants and electron transport chain enzymes following postnatal protein malnutrition. *Life Sciences* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.008>

269. Moreda-Piñeiro J, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera P. In vivo and in vitro testing for selenium and selenium compounds bioavailability assessment in foodstuff. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57:805–33.

270. Martins FS, Rodrigues ACP, Tiago FCP, Penna FJ, Rosa CA, Arantes RME, Nardi RMD, Neves MJ, Nicoli JR. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *Journal of Medical Microbiology*. 2007;56:352–9.

271. Martins FS, Elian SDA, Vieira AT, Tiago FCP, Martins AKS, Silva FCP, Souza ÉLS, Sousa LP, Araújo HRC, Pimenta PF, et al. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011;301:359–64.

272. Tiago FCP, Martins FS, Souza ELS, Pimenta PFP, Araujo HRC, Castro IM, Brandão RL, Nicoli JR. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *Journal of Medical Microbiology*. 2012;61:1194–207.

273. Tiago F c. p., Porto B a. a., Ribeiro N s., Moreira L m. c., Arantes R m. e., Vieira A t., Teixeira M m., Generoso S v., Nascimento V n., Martins F s., et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 in experimental model of inflammatory bowel disease. *Beneficial Microbes*. 2015;6:807–15.

274. Bastos R w., Pedroso S h. s. p., Vieira A t., Moreira L m. c., França C s., Cartelle C t., Arantes R m. e., Generoso S v., Cardoso V n., Neves M j., et al. *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. *Beneficial Microbes*. 2016;7:549–57.

275. Porto BAA, Monteiro CF, Souza ÉLS, Leocádio PCL, Alvarez-Leite JI, Generoso SV, Cardoso VN, Almeida-Leite CM, Santos DA, Santos JRA, et al. Treatment with selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 partially ameliorates mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019;84:117–26.

276. Hamid M, Abdulrahim Y, Liu D, Qian G, Khan A, Huang K. The Hepatoprotective Effect of Selenium-Enriched Yeast and Gum Arabic Combination on Carbon Tetrachloride-Induced Chronic

Liver Injury in Rats. *J Food Sci.* 2018;83:525–34.

277. Bhutta ZA, Berkley JA, Bandsma RHJ, Kerac M, Trehan I, Briend A. Severe childhood malnutrition. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17067.

278. Lanyero B, Namusoke H, Nabukeera-Barungi N, Grenov B, Mupere E, Michaelsen KF, Mølgaard C, Christensen VB, Friis H, Briend A. Transition from F-75 to ready-to-use therapeutic food in children with severe acute malnutrition, an observational study in Uganda. *Nutr J.* 2017;16:52.

279. Tickell KD, Denno DM. Inpatient management of children with severe acute malnutrition: a review of WHO guidelines. *Bulletin of the World Health Organization.* 2016;94:642–51.

280. Mehus AA, Picklo MJ. Brain and Hepatic Mt mRNA Is Reduced in Response to Mild Energy Restriction and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency in Juvenile Rats. *Nutrients.* 2017;9.

281. Eyzaguirre-Velasquez J, Olavarria-Ramirez L, Gonzalez-Arancibia C, Diaz-Merino C, Ariz R, Lopez S, Quiroz W, Beltran CJ, Bravo JA, Julio-Pieper M. Protein Malnutrition During Juvenile Age Increases Ileal and Colonic Permeability in the Rat. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* 2016;00:1–7.

282. Jahng JW, Kim JG, Kim HJ, Kim B-T, Kang D-W, Lee J-H. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Res.* 2007;1150:100–7.

283. Holloway PM, Gillespie S, Becker F, Vital SA, Nguyen V, Alexander JS, Evans PC, Gavins FNE. Sulforaphane induces neurovascular protection against a systemic inflammatory challenge via both Nrf2-dependent and independent pathways. *Vascul Pharmacol.* 2016;85:29–38.

284. Cai KC, van Mil S, Murray E, Mallet J-F, Matar C, Ismail N. Age and sex differences in immune response following LPS treatment in mice. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2016;58:327–337.

285. Bandsma RHJ, Ackerley C, Koulajian K, Zhang L, Zutphen TV, Dijk THV, Xiao C, Giacca A, Lewis GF. A low-protein diet combined with low-dose endotoxin leads to changes in glucose homeostasis in weanling rats. 2015;466–473.

286. Whitfield-Cargile CM, Cohen ND, Chapkin RS, Weeks BR, Davidson LA, Goldsby JS, Hunt CL, Steinmeyer SH, Menon R, Suchodolski JS, et al. The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes.* 2016;7:246–261.

287. Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Mizuno S, Rikitake Y. Preventative effects of sodium

alginate on indomethacin-induced small-intestinal injury in mice. *International Journal of Medical Sciences*. 2016;13:653–663.

288. Yoshikawa K, Kurihara C, Furuhashi H, Takajo T, Maruta K, Yasutake Y, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Higashiyama M, et al. Psychological stress exacerbates NSAID-induced small bowel injury by inducing changes in intestinal microbiota and permeability via glucocorticoid receptor signaling. *Journal of Gastroenterology*. 2017;52:61–71.

289. Han Y-M, Park J-M, Kang JX, Cha J-Y, Lee H-J, Jeong M, Go E-J, Hahm KB. Mitigation of indomethacin-induced gastrointestinal damages in fat-1 transgenic mice via gate-keeper action of  $\omega$ -3-polyunsaturated fatty acids. *Scientific Reports*. 2016;6:33992.

290. Tanaka A, Hase S, Miyazawa T, Ohno R, Takeuchi K. Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303:1248–54.

291. Fock RA, Vinolo MAR, de Moura Sá Rocha V, de Sá Rocha LC, Borelli P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF- $\alpha$  in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine*. 2007;40:105–114.

292. Jacob M, Foster R, Sigthorsson G, Simpson R, Bjarnason I. Role of bile in pathogenesis of indomethacin-induced enteropathy. *Archives of Toxicology*. 2007;81:291–8.

293. Kimura T, Hino K, Kono T, Takano A, Nitta N, Ushio N, Hino S, Takase R, Kudo M, Daigo Y, et al. Maternal undernutrition during early pregnancy inhibits postnatal growth of the tibia in the female offspring of rats by alteration of chondrogenesis. *Gen Comp Endocrinol*. 2018;260:58–66.

294. Schwarzer M, Makki K, Storelli G, Machuca-Gayet I, Srutkova D, Hermanova P, Martino ME, Balmand S, Hudcovic T, Heddi A, et al. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science*. 2016;351:854–857.

295. Njunge JM, Gwela A, Kibinge NK, Ngari M, Nyamako L, Nyatichi E, Thitiri J, Gonzales GB, Bandsma RHJ, Walson JL, et al. Biomarkers of post-discharge mortality among children with complicated severe acute malnutrition. *Sci Rep*. 2019;9:5981.

296. Yamada S, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hirai Y, Horie R, Fukumoto K, Inoue K, Harusato A, Yoshida N, et al. Reduced small-intestinal injury induced by indomethacin in interleukin-17A-deficient mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26:398–404.

297. Nasioudis D, Witkin SS. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune

responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol*. 2015;204:471–9.

298. Prata M de MG, Havt A, Bolick DT, Pinkerton R, Lima A, Guerrant RL. Comparisons between myeloperoxidase, lactoferrin, calprotectin and lipocalin-2, as fecal biomarkers of intestinal inflammation in malnourished children. *J Transl Sci*. 2016;2:134–9.

299. Mayneris-Perxachs J, Bolick DT, Leng J, Medlock GL, Kolling GL, Papin JA, Swann JR, Guerrant RL. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype. *Am J Clin Nutr*. 2016;104:1253–62.

300. Moore JH, Pinheiro CCD, Zaenker EI, Bolick DT, Kolling GL, Van Opstal E, Noronha FJD, De Medeiros PHQS, Rodriguez RS, Lima AA, et al. Defined nutrient diets alter susceptibility to clostridium difficile associated disease in a murine model. *PLoS ONE*. 2015;10:1–16.

301. Arora S, Anubhuti null. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*. 2006;40:375–401.

302. Matsuzaki T, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Yamasaki M, Murakami M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, et al. The responses of hypothalamic NPY and OBRb mRNA expression to food deprivation develop during the neonatal-prepubertal period and exhibit gender differences in rats. *Int J Dev Neurosci*. 2015;41:63–7.

303. Baver SB, Hope K, Guyot S, Bjørbaek C, Kaczorowski C, O'Connell KMS. Leptin modulates the intrinsic excitability of AgRP/NPY neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*. 2014;34:5486–96.

304. Robertson LT, Treviño-Villarreal JH, Mejia P, Grondin Y, Harputlugil E, Hine C, Vargas D, Zheng H, Ozaki CK, Kristal BS, et al. Protein and Calorie Restriction Contribute Additively to Protection from Renal Ischemia Reperfusion Injury Partly via Leptin Reduction in Male Mice. *J Nutr*. 2015;145:1717–27.

305. Ould Hamouda H, Delplanque B, Benomar Y, Crépin D, Riffault L, LeRuyet P, Bonhomme C, Taouis M. Milk-soluble formula increases food intake and reduces Il6 expression in elderly rat hypothalami. *J Endocrinol*. 2015;226:67–80.

306. Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA. TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides*. 2007;28:1050–8.

307. Hao L, Sheng Z, Potian J, Deak A, Rohowsky-Kochan C, Routh VH. Lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) blunt the response of Neuropeptide Y/Agouti-related peptide



(NPY/AgRP) glucose inhibited (GI) neurons to decreased glucose. *Brain Res.* 2016;1648:181–92.

308. Picou D, Taylor-Roberts T. The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states and receiving different amounts of dietary protein. *Clinical Science.* 1969;36:283–96.

309. Collins S, Myatt M, Golden B. Dietary treatment of severe malnutrition in adults. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:193–9.

310. Patrick J, Golden M. Leukocyte electrolytes and sodium transport in protein energy malnutrition. *Am J Clin Nutr.* 1977;30:1478–81.

311. Sadre M, Hedayat H, Gharib M, Ghavam Z, Donoso G. Dehydration syndrome in malnourished Iranian children. *Am J Clin Nutr.* 1969;22:139–46.

312. Khan LUR, Ahmed J, Khan S, Macfie J. Refeeding syndrome: a literature review. *Gastroenterol Res Pract.* 2011;2011.

313. Maldonado Galdeano C, Novotny Núñez I, de Moreno de LeBlanc A, Carmuega E, Weill R, Perdigón G. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-malnutrition model in mice. *BMC gastroenterology.* 2011;11:64.

314. Ueno PM, Oriá RB, Maier EA, Guedes M, Azevedo OGD, Wu D, Willson T, Hogan SP, Lima AAM, Guerrant RL, et al. Alanine-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;612–622.

315. Tsai P-Y, Zhang B, He W-Q, Zha J-M, Odenwald MA, Singh G, Tamura A, Shen L, Sailer A, Yeruva S, et al. IL-22 Upregulates Epithelial Claudin-2 to Drive Diarrhea and Enteric Pathogen Clearance. *Cell Host Microbe.* 2017;21:671-681.e4.

316. Rosenthal R, Günzel D, Krug SM, Schulzke J-D, Fromm M, Yu ASL. Claudin-2-mediated cation and water transport share a common pore. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219:521–36.

317. Tamura A, Hayashi H, Imasato M, Yamazaki Y, Hagiwara A, Wada M, Noda T, Watanabe M, Suzuki Y, Tsukita S. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na<sup>+</sup> deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology.* 2011;140:913–923.

318. Codipilly CN, Wapnir RA. Proabsorptive action of gum arabic in isotonic solutions orally administered to rats. II. Effects on solutes under normal and secretory conditions. *Dig Dis Sci.* 2004;49:1473–8.

319. Li M, van Esch BCAM, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ. Pro- and anti-

inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*. 2018;831:52–9.

320. Huang S, Wu Z, Liu C, Han D, Feng C, Wang S, Wang J. Milk Fat Globule Membrane Supplementation Promotes Neonatal Growth and Alleviates Inflammation in Low-Birth-Weight Mice Treated with Lipopolysaccharide. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 9];2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6521396/>

321. Xiao K, Jiao L, Cao S, Song Z, Hu C, Han X. Whey protein concentrate enhances intestinal integrity and influences transforming growth factor- $\beta$ 1 and mitogen-activated protein kinase signalling pathways in piglets after lipopolysaccharide challenge. *Br J Nutr*. 2016;115:984–93.

322. Tenore GC, Pagano E, Lama S, Vanacore D, Di Maro S, Maisto M, Capasso R, Merlino F, Borrelli F, Stiuso P, et al. Intestinal Anti-Inflammatory Effect of a Peptide Derived from Gastrointestinal Digestion of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Mozzarella Cheese. *Nutrients*. 2019;11.

323. Rettedal EA, Altermann E, Roy NC, Dalziel JE. The Effects of Unfermented and Fermented Cow and Sheep Milk on the Gut Microbiota. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 1];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6423907/>

324. Liu Q, Ni X, Wang Q, Peng Z, Niu L, Wang H, Zhou Y, Sun H, Pan K, Jing B, et al. *Lactobacillus plantarum* BSGP201683 Isolated from Giant Panda Feces Attenuated Inflammation and Improved Gut Microflora in Mice Challenged with Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2017;8:1885.

325. Alarifi S, Bell A, Walton G. In vitro fermentation of gum acacia - impact on the faecal microbiota. *Int J Food Sci Nutr*. 2018;69:696–704.

326. Lv CH, Wang T, Regmi N, Chen X, Huang K, Liao SF. Effects of dietary supplementation of selenium-enriched probiotics on production performance and intestinal microbiota of weanling piglets raised under high ambient temperature. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2015;99:1161–1171.

327. Gangadoo S, Dinev I, Chapman J, Hughes RJ, Van TTH, Moore RJ, Stanley D. Selenium nanoparticles in poultry feed modify gut microbiota and increase abundance of *Faecalibacterium prausnitzii*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102:1455–66.

328. Huang X-L, Zhang X, Fei X-Y, Chen Z-G, Hao Y-P, Zhang S, Zhang M-M, Yu Y-Q, Yu C-G. *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis by regulating Th17 cell differentiation. *World J Gastroenterol*. 2016;22:5201–10.

329. Sugasini D, Lokesh BR. Enhanced incorporation of docosahexaenoic acid in serum, heart, and

brain of rats given microemulsions of fish oil. *Mol Cell Biochem.* 2013;382:203–16.

330. Schober ME, Requena DF, Casper TC, Velhorst AK, Lolofie A, McFarlane KE, Otto TE, Terry C, Gensel JC. Docosahexaenoic acid decreased neuroinflammation in rat pups after controlled cortical impact. *Exp Neurol.* 2019;320:112971.

331. Charpentier C, Chan R, Salameh E, Mbodji K, Ueno A, Coëffier M, Guérin C, Ghosh S, Savoye G, Marion-Letellier R. Dietary n-3 PUFA May Attenuate Experimental Colitis. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:8430614.

332. Mbodji K, Charpentier C, Guérin C, Querec C, Bole-Feysot C, Aziz M, Savoye G, Déchelotte P, Marion-Letellier R. Adjunct therapy of n-3 fatty acids to 5-ASA ameliorates inflammatory score and decreases NF- $\kappa$ B in rats with TNBS-induced colitis. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2013;24:700–705.

333. Casaril AM, Domingues M, Fronza M, Vieira B, Begnini K, Lenardão EJ, Seixas FK, Collares T, Nogueira CW, Savegnago L. Antidepressant-like effect of a new selenium-containing compound is accompanied by a reduction of neuroinflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-challenged mice. *J Psychopharmacol (Oxford).* 2017;31:1263–73.

## Valorisation des travaux de thèse

### 2017

#### **14 Novembre 2017 – 2<sup>ème</sup> Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB2017) – Caen**

**Poster** - Comparaison de deux modèles de malnutrition associant une dénutrition protéique et entéropathie environnementale. *Emmeline Salameh, Marine Jarbeau, Illona-Marie Boutelé, Wafa Bahlouli, Clément L'Huillier, Mamane Zeilani, Fanny Morel, Pierre Déchelotte, Rachel Marion-Letellier.*

#### **13-15 décembre 2017 – Journées Francophones de Nutrition (JFN2017) – Nantes**

**Poster** - Comparaison de deux modèles de malnutrition associant une dénutrition protéique et entéropathie environnementale. *Emmeline Salameh, Marine Jarbeau, Mamane Zeilani, Fanny Morel, Pierre Déchelotte, Rachel Marion-Letellier*

---

---

### 2018

#### **1-3 mars 2018 – Nutrition & Growth International Conference (N&G2018) – Paris**

**Poster** - Combinaison of protein-deprived diet and indomethacin triggers gut barrier dysfunction in mice. *Emmeline Salameh, Marine Jarbeau, Fanny Morel, Mamane Zeilani, Pierre Déchelotte, Rachel Marion-Letellier*

#### **6 Avril 2018 – Séminaire du Pôle Développement de Nutriset**

**Communication orale** – Présentation du projet de thèse au pôle développement de la société de Nutriset

---

---

### 2019

#### **7-9 mars 2019 - Nutrition & Growth International Conference (N&G2019) – Valence**

**Communication orale** - Consumption of low protein diet in combination with indomethacin induced growth failure and gut barrier dysfunction in mice. *Emmeline Salameh, Marine Jarbeau, Mamane Zeilani, Fanny Morel, Pierre Déchelotte, Rachel Marion-Letellier*

**31 août – 3 septembre 2019 – ESPEN European society for clinical nutrition and metabolism – Cracovie**

**Poster** Consumption of low protein diet in combination with indomethacin induced growth failure and gut barrier dysfunction in mice. *Emmeline Salameh, Marine Jarbeau, Mamane Zeilani, Fanny Morel, Pierre Déchelotte, Rachel Marion-Letellier*

## Annexes – Valorisation des travaux de Master 2

### Communications orales et posters affichés

#### 2016

**23-24 juin 2016 - Réunion Annuelle du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG2016) - Rouen**

**Communication orale** : Post-inflammatory visceral hypersensitivity is not associated with an increased intestinal permeability or a residual inflammation in rats with TNBS-induced chronic colitis. *Emmeline Salameh, Mathieu Meleine, Guillaume Gourcerol, Moïse Coëffier, Guillaume Savoye, Rachel Marion-Letellier*

**16 septembre 2016 - 1<sup>ère</sup> Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB2016) - Rouen**

**Poster** - Post-inflammatory sequels in rats with chronic colitis. *Emmeline Salameh, Mathieu Meleine, Guillaume Gourcerol, Moïse Coëffier, Guillaume Savoye, Rachel Marion-Letellier.*

---

---

#### 2018

**20 septembre 2018 – 3<sup>ème</sup> Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB2018) – Rouen.**

**Poster** – Développement d'un comportement anxieux dans un modèle de colite post-inflammatoire. *Emmeline Salameh, Mathieu Meleine, Guillaume Gourcerol, Jean-Claude do Rego, Jean-Luc do Rego, Romain Legrand, Jonathan Breton, Moutaz Aziz, Charlène Guérin, Moïse Coëffier, Pierre Déchelotte, Guillaume Savoye, Rachel Marion-Letellier*

**19 octobre 2018 – 22<sup>ème</sup> Journée du réseau LARC-Neurosciences – Mont-Saint-Aignan**

**Communication orale** - Chronic colitis-induced post-inflammatory visceral pain is associated with increased anxiety without gut barrier dysfunction. *Emmeline Salameh, Mathieu Meleine, Guillaume Gourcerol, Jean-Claude do Rego, Jean-Luc do Rego, Romain Legrand, Jonathan Breton, Moutaz Aziz, Charlène Guérin, Moïse Coëffier, Pierre Déchelotte, Guillaume Savoye, Rachel Marion-Letellier*

---

---

#### Article scientifique publié en premier auteur

##### **Chronic colitis-induced visceral pain is associated with increased anxiety during quiescent phase.**

Salameh E, Meleine M, Gourcerol G, do Rego JC, do Rego JL, Legrand R, Breton J, Aziz M, Guérin C, Coëffier M, Savoye G, Marion-Letellier R.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2019 Jun 1;316(6):G692-G700. doi: 10.1152/ajpgi.00248.2018. Epub 2019 Feb 8.

#### Articles scientifiques publiés en co-auteur

##### **Dietary n-3 PUFA May Attenuate Experimental Colitis.**

Charpentier C, Chan R, Salameh E, Mbodji K, Ueno A, Coëffier M, Guérin C, Ghosh S, Savoye G, Marion-Letellier R.

Mediators Inflamm. 2018 Feb 15;2018:8430614. doi: 10.1155/2018/8430614. eCollection 2018.

##### **Glutamine, but not Branched-Chain Amino Acids, Restores Intestinal Barrier Function during Activity-Based Anorexia.**

L'Huillier C, Jarbeau M, Achamrah N, Belmonte L, Amamou A, Nobis S, Goichon A, Salameh E, Bahlouli W, do Rego JL, Déchelotte P, Coëffier M.

Nutrients. 2019 Jun 15;11(6). pii: E1348. doi: 10.3390/nu11061348.