

UNIVERSITE CATHOLIQUE DE BUKAVU



FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PEDIATRIE

Analyse transversale de la relation entre la calprotectine fécale, l'entéropathie environnementale et le retard de croissance staturale chez les nourrissons allaités au sein dans la zone de santé de Miti-Murhesa

Par Joe BWIJA KASENGI
Docteur en Médecine, Chirurgie et Accouchement

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Médecin Spécialiste en Pédiatrie.

Promoteur : Professeur Dr Oreste BATTISTI
Co-Promoteur : Professeur Dr Ghislain BISIMWA

Décembre 2019

REMERCIEMENTS

Ma gratitude à l'Éternel Mon Dieu qui m'a toujours soutenu et guidé , et m'a accompagné dès les premiers mots du présent travail.

Mes remerciements les plus sincères et du fond de cœur à mes promoteurs Professeurs Drs Oreste BATTISTI et Ghislain BISIMWA qui, sans ménage de leur précieux temps ni de leur immense savoir, savoir être et savoir-faire , ont accepté de diriger ce travail jusqu'à ce jour.

Je remercie également les Professeurs Paluku BAHWERE, Bruno MASUMBUKO, Christiane VERMYLEN, Dimitri VAN DER LINDEN et Drs Ghislain MAHESHE, Dominique HERMANS, Joëlle VAN WINGHEM et Olga CHATZIS pour leurs conseils et appui.

Je remercie les parents de jeunes nourrissons qui ont courageusement accepté de briser les conditions météorologiques tôt le matin pour participer à cette étude,

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe qui a participé à la réalisation de cette étude sur terrain,

Ma gratitude à toute l'équipe médicale et infirmière du département de Pédiatrie pour leur soutien et appui indéfectibles,

Mes sincères remerciements à toute personne qui de près ou de loin a contribué à ma formation,

Enfin , j'exprime ma gratitude à ces personnes qui me sont très chères : mes parents, mes frères et sœurs, mes beaux-frères et belles-sœurs, mes neveux et nièces, mes amis et amies et ma moitié pour la vie, vous avez été d'un appui, d'un soutien et d'une aide incomparables.

ABBREVIATIONS

RDC : République démocratique du Congo

EDS : Enquête démographique de santé

AME : Allaitement maternel exclusif

MICS : Multiple Indicator Cluster Surveys

OMS : Organisation mondiale de la santé

TLR: Toll Like-Receptors

MAMPS: Microbe-Associated Molecular Patterns

LPS: Lipopolysaccharides

Trég : Lymphocytes T régulateurs.

Ig: Immunoglobuline

ZS : Zone de santé

DS : déviation standard

EIQ : Espace interquartile

KDa: Kilo daltons

ADN: Acide désoxyribonucléique.

IGF: Insuline growth factor

p : P-value

RESUME

Problématique

Le retard de croissance staturale chez les enfants constitue un problème de santé majeur dans les pays en développement notamment en République Démocratique du Congo (RDCongo). L'une des étiologies de ce retard serait l'entéropathie environnementale , entité où on décrit une inflammation intestinale qui peut être évaluée sur base des marqueurs non invasifs tels que la calprotectine fécale. Aucune étude publiée n'a été réalisée sur la calprotectine fécale et sa relation avec l'alimentation et le retard de croissance chez les nourrissons en RDCongo, c'est l'objectif de ce travail.

Méthodologie

Il s'agit d'une étude transversale menée dans un milieu rural, la Zone de Santé de Miti-Murhesa au Sud-Kivu. 25 nourrissons âgés de 4 à 7 mois révolus et suivis en consultation préscolaire ont été sélectionnés dans chaque aire de santé. Les données socio-démographiques, anthropométriques et nutritionnelles ont été collectées chez 240 nourrissons pour qui le dosage de la calprotectine fécale a été réalisé par la méthode immunochromatographique quantitative.

Résultats

Sur un total de 240 nourrissons, 125 (52%) étaient de sexe féminin et 55 (22,9%) étaient encore sous allaitement maternel exclusif. La médiane de calprotectine fécale était de 87 μ g/g de selles dans le groupe entier .Comparés aux nourrissons diversifiés, ceux sous allaitement maternel exclusif avaient une calprotectine fécale significativement plus élevée (*médiane* 108 μ g/g (40-245) vs 75 μ g/g (34-176), $p=0,03$). L'âge de la diversification alimentaire n'influait pas la calprotectine fécale. Les nourrissons en ralentissement de croissance staturale pour l'âge avaient une médiane de calprotectine fécale plus élevée que ceux avec une croissance staturale normale(*Médiane* 107 μ g/g (32-223) versus 82(37 -165), $p =0,48$).

Conclusion

La calprotectine fécale semble basse chez les nourrissons dans notre milieu d'étude. Cependant, la calprotectine fécale est plus élevée chez les nourrissons allaités exclusivement au sein et/ou présentant un retard de croissance staturale.

Mots -clés : Calprotectine fécale, Entéropathie environnementale, Retard de croissance staturale, nourrissons, allaitement au sein, Miti-murhesa.

I. INTRODUCTION

Le retard de croissance staturale reste un problème de santé publique majeur dans les pays en développement vu ses conséquences à court et long terme sur la survie[1]. Sa prévalence dépasse les 30 % dans certains de ces pays[2]. Depuis plus de 15 ans, la République Démocratique du Congo (RDC) est parmi les pays avec une prévalence très élevée du retard de croissance staturale [3] et la dernière enquête démographique de santé (EDS) a révélé une prévalence de 43%[4]. Dans cette EDS, la province du Sud-Kivu avait une prévalence supérieure à la moyenne nationale, soit 53% [4].

La physiopathologie de ce retard de croissance staturale reste mal comprise et plusieurs théories ont été proposées. On pense notamment aux aspects génétiques, à une alimentation complémentaire quantitativement et qualitativement inappropriée, aux carences spécifiques en certains micronutriments notamment en zinc et depuis peu de temps on évoque l'hypothèse d'une entité pathologique nommée «Entéropathie environnementale» caractérisée par une inflammation de la muqueuse intestinale perturbant les fonctions digestives et absorptives de cette muqueuse[5][6].

Dans le cadre de la lutte contre ce retard de croissance, plusieurs interventions ont été proposées et tentées sans grands résultats [7][8][9][10] notamment la supplémentation des nourrissons en Zinc, le déparasitage systématique des enfants de moins de 5 ans, l'utilisation de l'amylase pour améliorer la densité énergétique des bouillies de supplémentation afin de couvrir les besoins journaliers en micronutriments essentiels[7], [9][10][11]. Au Sud Kivu, la supplémentation en zinc des nourrissons de 3-4 mois n'avait pas amélioré de manière significative la croissance en taille[12]. De même la supplémentation des nourrissons de 6 mois à 12 mois en aliments de compléments permettant de couvrir leurs besoins journaliers en nutriments essentiels y compris en micronutriments n'avait pas non plus montré des effets significatifs sur la croissance staturale des enfants[13].

Les chercheurs ont ainsi considéré l'hypothèse d'une «Entéropathie environnementale dès le jeune âge » pour expliquer l'absence d'effet de ces interventions. Celle-ci interfèrerait avec l'absorption des nutriments[14][15][16][17][18]. Une étude a effectivement montré que la prévalence d'«Entéropathie environnementale » était élevée dans la région notamment chez les enfants souffrant de malnutrition aiguë[19]. Néanmoins, l'étude ne comprenait pas les nourrissons de moins de 6 mois pourtant la cassure de la courbe de croissance staturale survient généralement à partir de 3-4ème mois d'âge[20]. Théoriquement, à 3-4 mois d'âge, les nourrissons devraient être protégés de l'«Entéropathie environnementale » par l'allaitement maternel exclusif mais l'introduction précoce des aliments de compléments est encore courante. Par exemple en RDC, le taux d'allaitement maternel exclusif est estimé à 21,8% pour les enfants de 4-5 mois (EDS 2012)[21] et à 37% pour les nourrissons de 0-5 mois[22]. Pour cette dernière enquête, la province du Sud Kivu a un taux d'AME estimée à 38%.

Il est aujourd’hui possible de détecter la présence d’inflammation intestinale par des techniques non-invasives notamment par le dosage de la calprotectine dans les selles. Malgré la controverse sur la signification de la concentration élevée de calprotectine dans les selles des nourrissons de moins d’un an et celle sur l’effet du type d’alimentation du nourrisson sur ce même taux, le dosage de la calprotectine fécale reste parmi les tests de référence pour l’évaluation de l’inflammation intestinale [23][24].

L’objectif de cette étude est de déterminer la concentration de calprotectine fécale chez les nourrissons de 4 à 7 mois , de comparer la calprotectine fécale des nourrissons sous allaitement maternel exclusif à celle des nourrissons avec alimentation diversifiée et déterminer s’il y a une association entre la calprotectine fécale et le retard de croissance staturale chez les nourrissons vivant en milieu rural au Sud-Kivu.

Objectifs.

1. Objectif général

Contribuer à l’amélioration des connaissances en vue d’une meilleure prise en charge de la santé des enfants dans la province du Sud Kivu.

2. Objectifs spécifiques

Il est question de confirmer si l’inflammation intestinale mesurée par la calprotectine fécale jouerait déjà un rôle dans la survenue du retard de croissance staturale dès l’âge de 4 à 7 mois :

- ❖ Déterminer la concentration de la calprotectine fécale chez les nourrissons de 4-7 mois et déterminer la fréquence de l’inflammation intestinale,
- ❖ Comparer la calprotectine fécale des nourrissons sous allaitement maternel exclusif à celle des nourrissons ayant déjà une alimentation diversifiée,
- ❖ Comparer la concentration de la calprotectine dans les selles des nourrissons de 4-7 mois ayant une croissance acceptable à celle des nourrissons en retard de croissance avéré.

II. GENERALITES THEORIQUES

A. LE RETARD DE CROISSANCE

A.1. Introduction

Le retard de croissance staturale ou mieux le ralentissement de la croissance staturale ou encore la malnutrition chronique ou enfin "stunting en anglais" affecte 151 millions d'enfants, soit plus d'un enfant sur 4, de moins de cinq ans dans le monde. 39% d'enfants en retard de croissance staturale vivent en Afrique.

A.2. Diagnostic

L'OMS définit le retard de croissance staturale ou malnutrition chronique par un Z-score de taille-âge inférieur ou égal à -2 déviation standard (DS).

A.3. Contexte, causes et conséquences

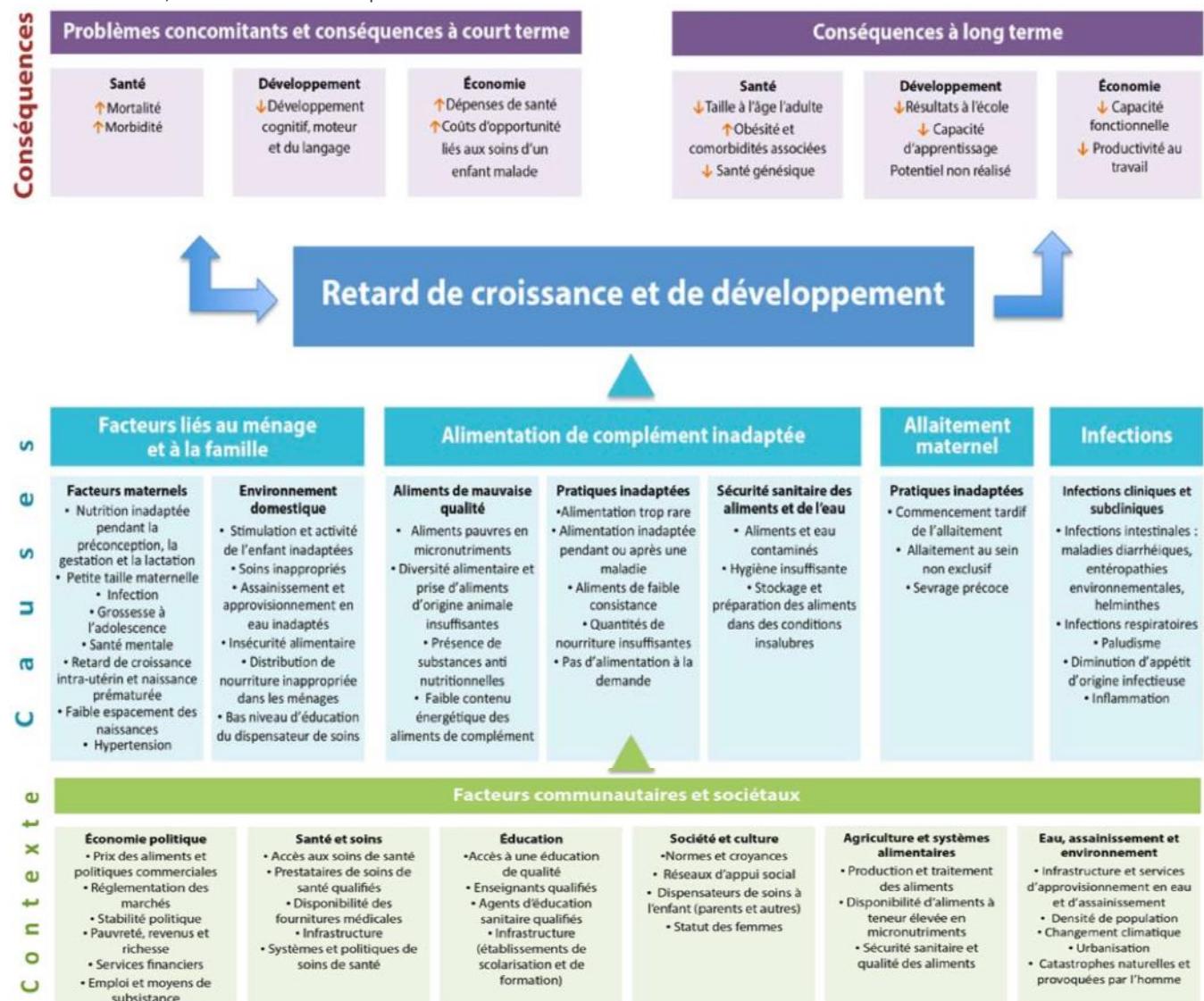


Figure 1. Contexte, causes et conséquences du retard de croissance [25]

B. ENTEROPATHIE ENVIRONNEMENTALE

B.1. Introduction

L'entéropathie environnementale est une entité complexe caractérisée par une inflammation chronique de l'intestin grêle avec :

- une atrophie intestinale et un raccourcissement des villosités,
- une infiltration de cellules immunes dans l'intestin,
- une dysbiose : un changement dans la composition du microbiote intestinal.

Les premières descriptions de l'entéropathie environnementale, précédemment connue sous le nom d' « entéropathie tropicale », remontent aux années 1960. L'entéropathie tropicale a été renommée « entéropathie environnementale » à la fin des années 2000 en raison de nouvelles preuves selon lesquelles la qualité de l'environnement était plus importante que le climat ou la latitude. Il a été renommé « dysfonction entérique environnementale » au cours de l'année 2014. La dysfonction entérique environnementale ne se limite pas aux régions tropicales et ne concerne pas non plus tous les résidents des tropiques[26].

B.2. Pathogénèse

L'étiologie spécifique de l'entéropathie environnementale n'est pas connue mais elle serait hypothétiquement due à une exposition continue aux aliments et à l'eau contaminés par les matières fécales dans les conditions d'hygiène précaires. L'hypothèse de la pathogénie de l'entéropathie environnementale est résumée sur la figure 2.

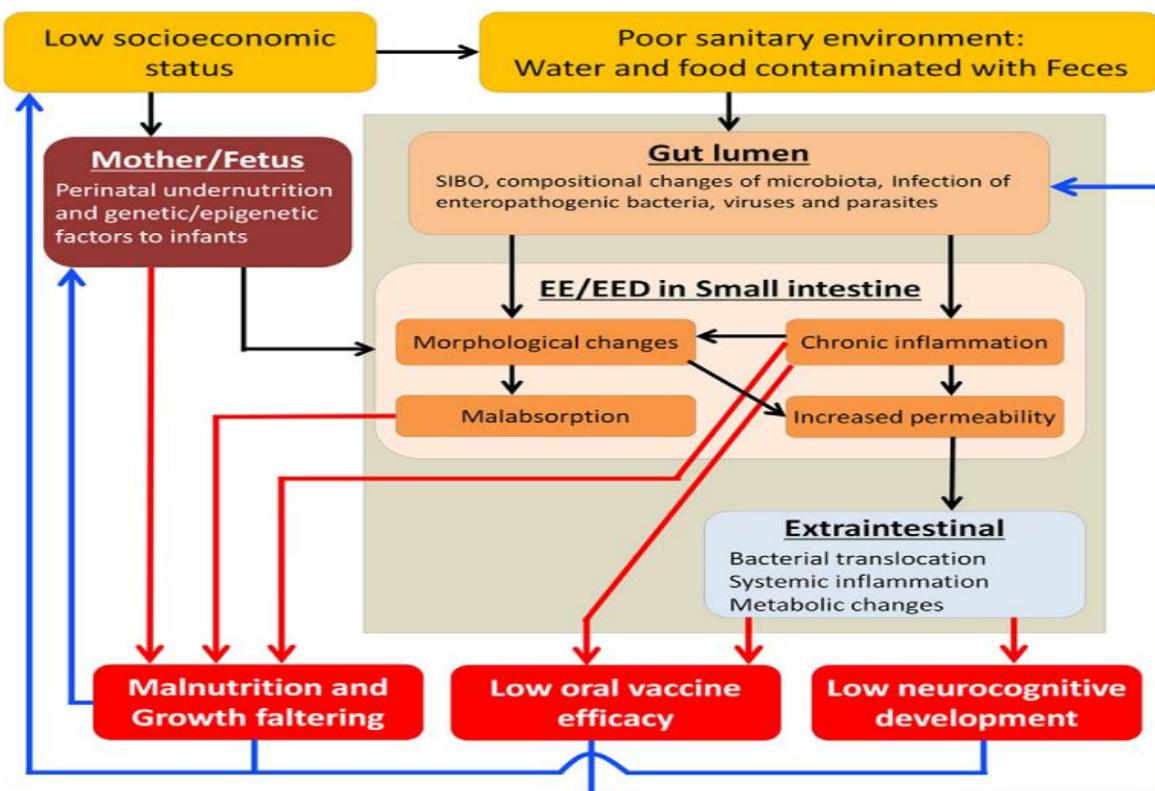


Figure 2. Pathogénèse de l'entéropathie environnementale[27].

Par ailleurs, des évidences sur la pathobiologie de l'entéropathie environnementale s'accumulent progressivement comme résumée sur la figure ci-dessous.

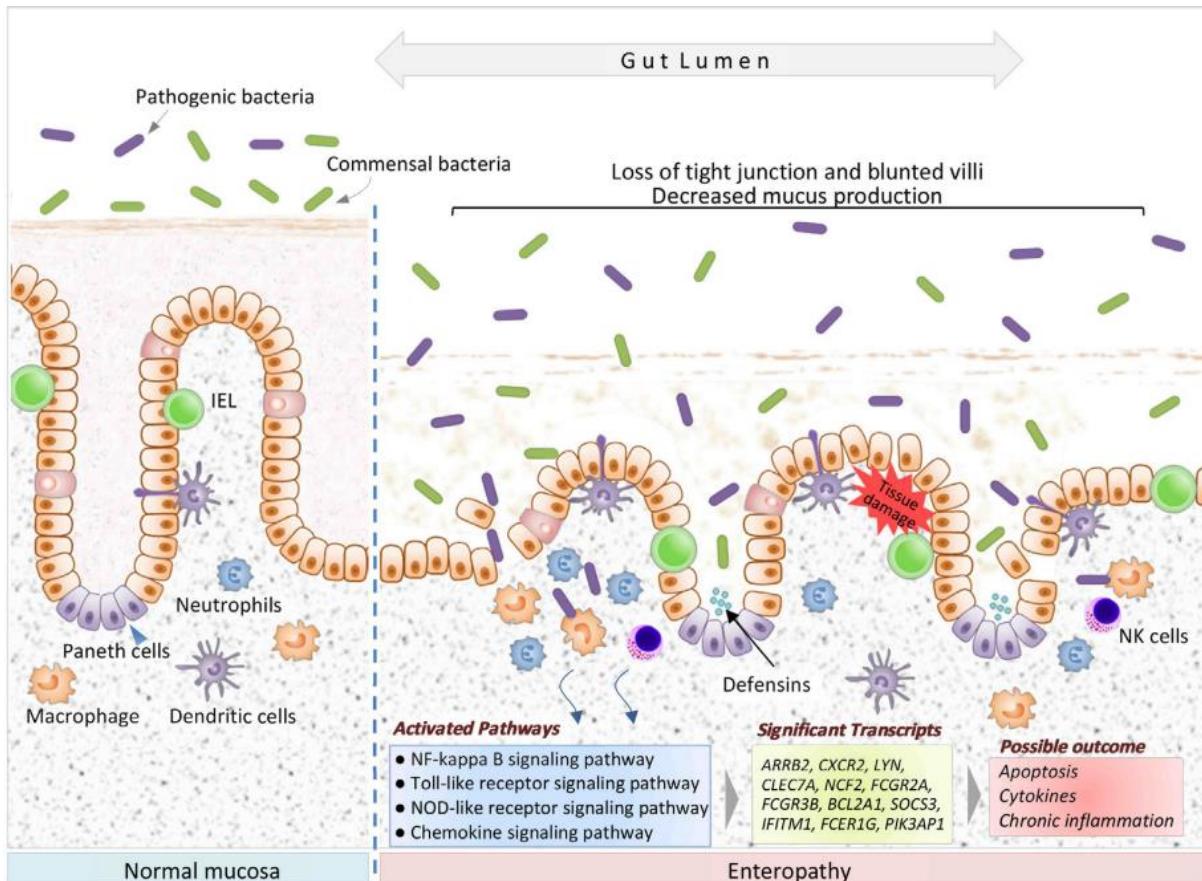


Figure 3. Résumé de la compréhension actuelle de la pathobiologie de l'entéropathie environnementale[28].

B.3. Diagnostic

L'entéropathie environnementale n'a pas de symptomatologie clinique apparente et il n'existe pas encore des critères diagnostic spécifiques[26][27].

Dans l'entéropathie environnementale, les anomalies histopathologiques suivantes ont été décrites : l'atrophie des villosités, hyperplasie des cryptes, infiltration lymphocytaire de la lamina propria et l'augmentation des lymphocytes intra-épithéliaux [27] mais ces anomalies ne sont pas spécifiques à l'entéropathie environnementale.

Par ailleurs, le diagnostic histopathologique requiert la réalisation d'une biopsie de l'intestin grêle qui est un examen très invasif chez les jeunes enfants de moins de 2 ans d'où la nécessité de développer des méthodes simples, non invasives et aussi accessibles dans les pays en développement comme les marqueurs biologiques dosables dans le sang, les urines ou les selles.

Il existe plus de 20 biomarqueurs utilisés pour le diagnostic de l'entéropathie environnementale avec spécificité et sensibilité différentes entre eux. Ces marqueurs peuvent être groupés selon les différents mécanismes décrits dans l'entéropathie environnementale :

- ❖ Marqueurs de l'inflammation intestinale dosables dans les selles :
 - Calprotectine fécale,
 - Myéloperoxidase,
 - Néoptérine,
 - Alpha-1-antitrypsine,
 - Lactoférrine.
 - REG1b
 - mRNA
- ❖ Marqueurs de la perméabilité intestinale :
 - Lactulose -mannitol
 - Zonuline
 - EndoCAb
 - CD14 soluble,
- ❖ Marqueurs de la masse entérocytaire totale :
 - Citrulline.

C. LA CALPROTECTINE FÉCALE.

C.1. Introduction

La calprotectine a été identifiée pour la première fois en 1980 par Fagerhol et collègues qui l'avaient nommé «L1 protéine »[29]. La découverte de ses propriétés antibactériennes et antifungiques par compétition avec le zinc ainsi que l'interaction avec 6 atomes de calcium lui ont secondairement conféré ce nom de calprotectine.

La calprotectine est une protéine de liaison au Calcium et au Zinc de 36 KDa de la famille de S100. Pour les neutrophiles, elle représente 5% des protéines totales et environ 60% des protéines cytosoliques. Elle est aussi présente dans les monocytes, macrophages et cellules épithéliales. Elle est sécrétée par les cellules immunitaires activées ou au cours de la mort cellulaire, par translocation des granulocytes au sein de la muqueuse intestinale[30][31].

De ce fait, la calprotectine fécale est utilisée comme marqueur d'inflammation intestinale. Son dosage dans les selles constitue un moyen non invasif d'évaluer une inflammation intestinale. La calprotectine se conserve bien dans les selles pendant une semaine à l'air ambiant.

Elle a démontré une sensibilité entre 80-100% dans la distinction entre atteintes digestives organiques et non organiques (fonctionnelles). Cependant, le dosage de la calprotectine fécale n'est pas spécifique d'une et d'une autre maladie inflammatoire de l'intestin[32].

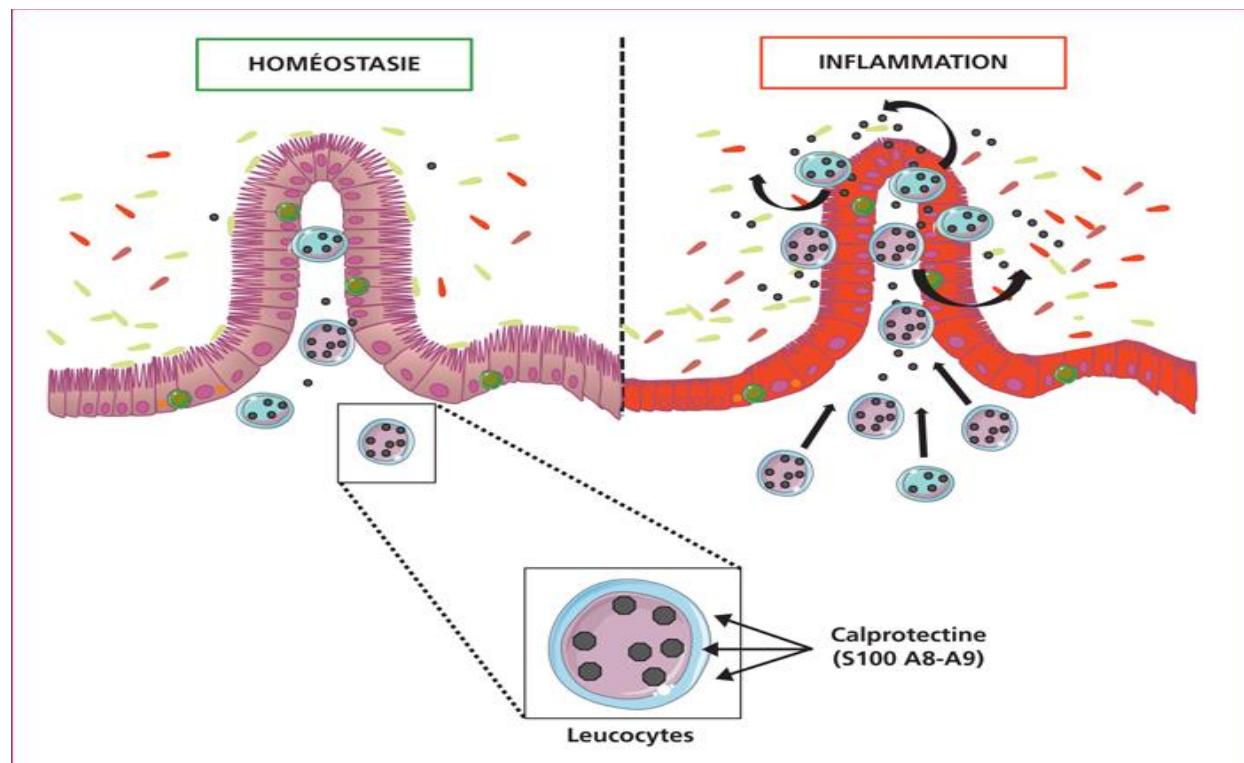


Figure 4. Production de la calprotectine fécale.

C.2. Méthodes de dosage

Les méthodes de dosage reposent toutes à l'heure actuelle sur l'immunodosage. Il existe deux procédés EK-CAL et EliaTMCalprotectine.

Dans les deux méthodes ci -haut, 50 à 100 mg de l'échantillon de selles est traité afin d'en extraire la calprotectine qui se retrouve par la suite en solution. Puis, le dosage proprement dit est fait en des étapes successives d'incubation et de lavage. La solution issue de l'étape d'extraction est déposée dans des puits déjà recouverts d'anticorps monoclonaux qui capturent la calprotectine. Ensuite sont ajoutés d'autres anticorps monoclonaux qui reconnaissent également la calprotectine et qui sont conjugués à une enzyme (différente selon l'essai). Enfin, l'ajout d'un substrat propre à l'enzyme utilisée permet la détection des complexes anticorps-calprotectine, soit par une réaction qui génère de la couleur (EK-CAL), soit par une autre réaction qui provoque l'émission de fluorescence (EliATM Calprotectin).

La détermination de la concentration en calprotectine est donc faite par lecture, soit de l'absorbance (EK-CAL), soit de la fluorescence (EliATM Calprotectin), à l'aide d'appareils qui comparent les valeurs des échantillons à celles de standards. Le dosage est quantitatif.

C.3. Valeurs de référence

Les valeurs de référence de la calprotectine fécale existent pour les enfants de plus de 4 ans et les adultes. A ce jour, il n'existe aucun consensus sur les valeurs de référence chez les enfants de moins de 4 ans[33].

Valeurs de référence de calprotectine fécale chez les enfants de plus de 4 ans et les adultes

	Calprotectine fécale µg/g de selles
Normale	< 50
Atteinte intestinale fonctionnelle ou organique.	50 - 200
Atteinte intestinale organique active	>150

D. PLACE DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME IMMUNITAIRE INTESTINAL CHEZ LES NOURRISSONS.

D.1. Généralités

Le tractus gastro-intestinal joue un double rôle dans la physiologie humaine : la digestion et l'absorption des nutriments et la tâche plus ardue de maintien de l'homéostasie immunitaire. En effet, le tractus gastro-intestinal doit protéger l'organisme contre les germes potentiellement pathogènes tout en offrant un environnement tolérant aux microbes commensaux, aux antigènes alimentaires et aux auto-antigènes[34].

L'architecture du tractus gastro-intestinal est faite pour faciliter ce double rôle. La vaste surface du tractus gastro-intestinal 200 m² chez l'adulte est le résultat de plusieurs niveaux d'invagination au niveau du tissu (plis de Kerkring), au niveau cellulaire (vilosités) et au niveau de la membrane cellulaire (microvilosités). Au niveau cellulaire, les villosités sont bordées de cellules épithéliales intestinales. Celles-ci possèdent des microvilosités absorbantes pour optimiser l'absorption des nutriments libérés lors de la digestion. Les extrémités des microvilosités forment le glycocalyx à bordure en brosse filamenteuse constitué d'une couche de glycoprotéines ancrées dans la membrane, qui permettent aux nutriments de traverser tout en limitant l'entrée de bactéries entières ou de grosses molécules[35].

Pour bloquer l'entrée et/ou réduire les dommages causés par les germes potentiellement pathogènes, le tractus gastro-intestinal possède un répertoire efficace de mécanismes de défense [36]:

- Eléments « luminaux » : mucus (cellules caliciformes), IgA sécrétoires, microbiote saprophyte, flux alimentaire et sécrétions gastriques et biliaires.
- La barrière entérocytaire : bordure en brosse et glycocalix, renouvellement rapide et maturation constante des entérocytes
- L'immunité spécifique : cellules immunocompétentes du tissu conjonctif riches en lymphocytes, macrophages, etc...

Chez l'enfant, il existe une immaturité de défenses digestives en particulier les sécrétions digestives, sécrétions d'IgA (d'où l'intérêt du lait maternel), le microbiote et l'immunité spécifique.

Le tractus gastro-intestinal a traditionnellement été considéré *in utero* comme stérile jusqu'à ce qu'il soit colonisé par des micro-organismes à la naissance au moment de la délivrance lorsque le nouveau-né est exposé à une avalanche des microbes constituant des microbiotes vaginaux et fécaux maternels. Néanmoins, certaines études ont révélé la présence de micro-organismes dans le liquide amniotique, les membranes fœtales, le placenta, le cordon ombilical et le méconium[37][38][39][40][41].

La mise en place du microbiote dans le tractus gastro-intestinal au début de la vie joue un rôle essentiel dans les voies de développement immunitaires, endocriniennes et métaboliques de l'hôte[42].

L'établissement du microbiote intestinal chez l'enfant est influencé par plusieurs facteurs comme le mode d'accouchement (voie basse versus césarienne), le type de l'alimentation (l'allaitement maternel versus artificiel), l'usage des antibiotiques, la période de l'introduction des aliments solides et de la cessation de l'allaitement (figure 5)[43]. La composition et la diversité bactériennes ressemblent à celles de l'adulte vers environ 3 ans[44].

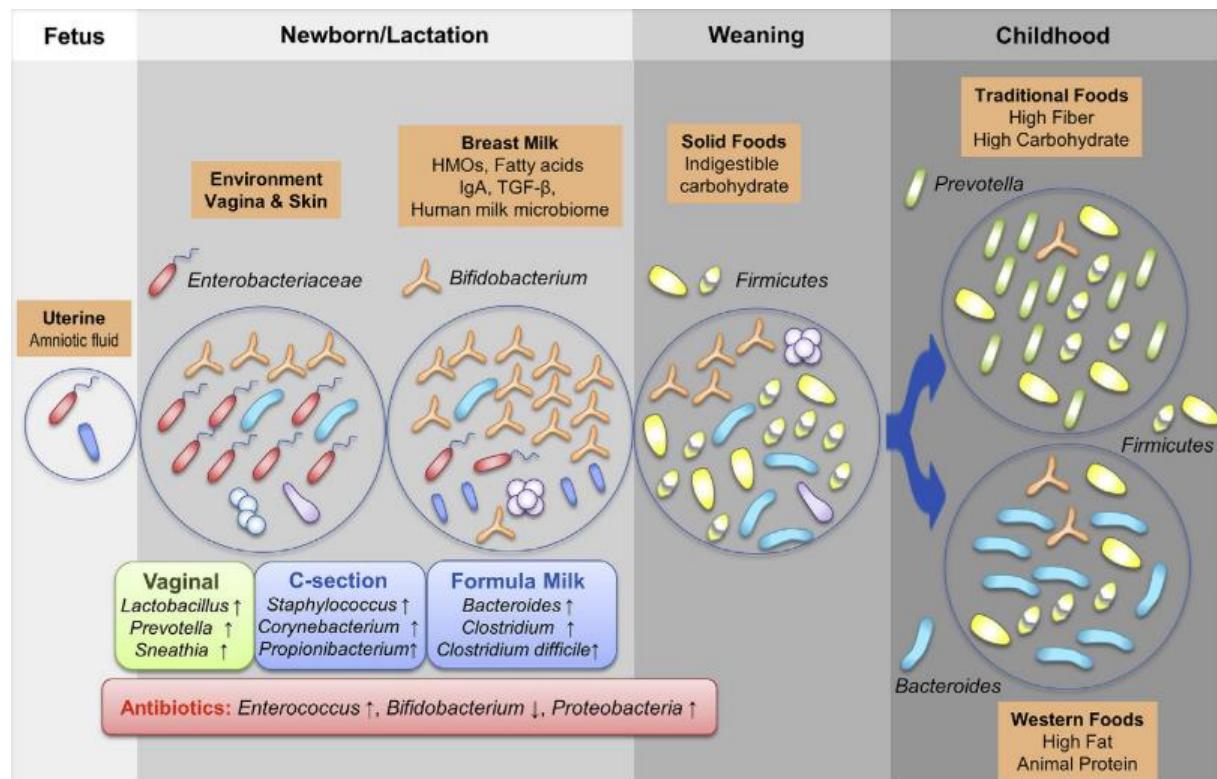
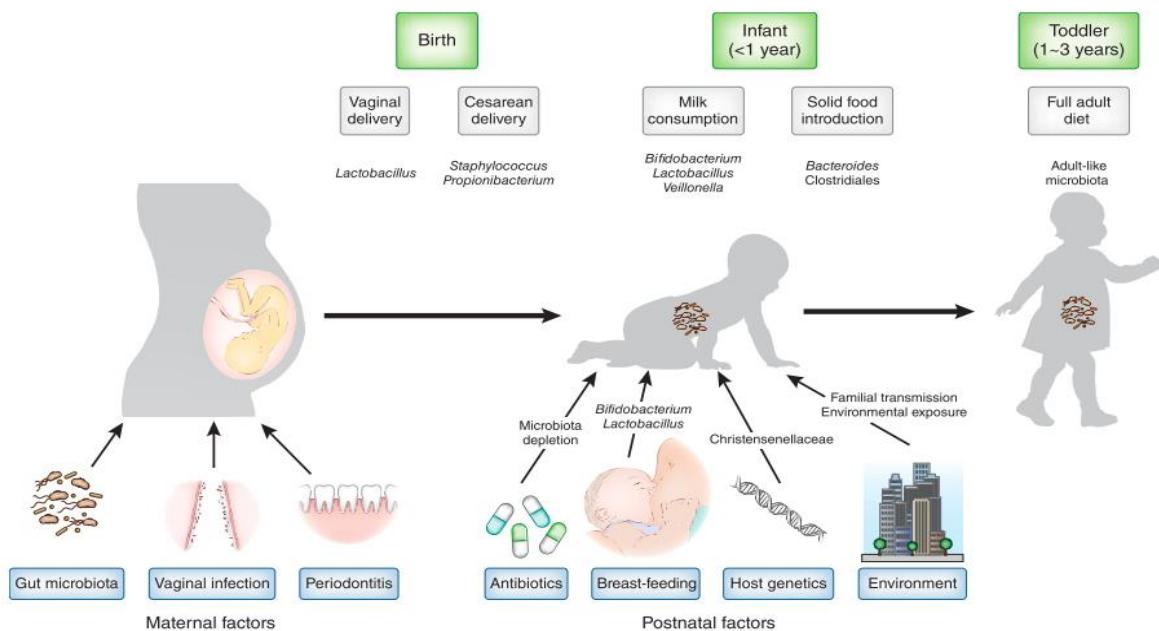


Figure 5 et 6. Facteurs influençant le microbiote intestinal chez l'enfant[45].

D.2. Interaction entre le microbiote intestinal et l'immunité de l'hôte.

L'établissement du microbiote intestinal entre la petite enfance et la diversification alimentaire est associé au développement du système immunitaire. L'impact des modifications du microbiote intestinal sur le système immunitaire n'est pas surprenant, étant donné les nombreuses façons dont les bactéries interagissent avec le système immunitaire et modulent son activité[43].

En effet, l'immunité innée, qui reconnaît le plus tôt les microbes, est surtout développée dans le tractus intestinal où diverses cellules immunitaires et épithéliales codent pour des molécules membranaires réceptrices des ligands d'origine microbienne, les Toll-like Receptors (TLR). Ces TLR suppriment l'apparition d'une réponse inflammatoire et favorisent la tolérance immunologique aux composants normaux du microbiote intestinal. Le rôle de ces récepteurs TLR est la reconnaissance de différentes molécules associées aux microbes (Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMPS en anglais) contenant des antigènes bactériens tels que les polysaccharides capsulaires (PSA) et les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycans ,l'acide muramique, la flagelline et les motifs Cytosine-p-Guanine non méthylés caractéristiques de l'ADN bactérien[43][46][47].

En réponse à ces ligands, des cytokines qui sont produites modifient la différenciation des lymphocytes T naïfs du système immunitaire adaptatif. Ces lymphocytes T naïfs peuvent se différencier en cellules régulatrices (Treg) ou en différents types de cellules auxiliaires (Th), principalement Th1, Th2 et Th17[48][49].

Les lymphocytes Treg suppriment l'activation et le développement de lymphocytes T naïfs vis-à-vis des types Th [49]–[51] et ont divers rôles anti-inflammatoires, notamment la suppression des activités inflammatoires des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles [52], la suppression de l'immunoglobuline (Ig) E et induction d'IgG4 [53]. D'autre part, chaque type de cellule Th joue un rôle distinct et clé dans la direction et l'amplification de la réponse immunitaire [49][54], [55], tout en produisant un profil de cytokine capable de supprimer d'autres types de Th[56], [57].

Depuis longtemps , la régulation mutuelle entre les cellules Th1 et Th2 (la balance Th1 / Th2) a été considéré comme le facteur clé pour l'homéostasie immunitaire. Une activation excessive de Th1 ou Th2 entraîne respectivement une maladie inflammatoire et auto-immune chronique ou une maladie allergique [58][59]. Cependant, de nouvelles évidences indiquent des rôles majeurs pour les cellules Th17. Celles-ci semblent jouer un rôle important dans les maladies classiquement définies comme médiées par Th1 ou Th2 [58][60][61], ainsi que dans les Treg et leurs actions anti-inflammatoires [62].

Celà étant, une colonisation microbienne intestinale inadéquate entraîne principalement un déséquilibre entre les cellules Treg et leurs cibles effectrices, les différentes cellules Th, et la dérégulation ultérieure de la réponse immunitaire peut favoriser une variété de pathologies dont l'entéropathie environnementale [62][63].

III. METHODOLOGIE

Il s'agit d'une étude transversale qui a été menée dans la Zone de santé (ZS) de Miti- Murhesa située dans la Province du Sud Kivu à l'Est de la République Démocratique du Congo. La zone de santé de Miti-Murhesa est située dans le territoire de Kabare qui compte comme principales activités l'agriculture, l'élevage et la pêche. L'étude a été menée dans 8 aires de santé de la ZS (Kavumu, Mbayo, Kashusha, Mushunguri, Lwiro, Kahungu, Buhandahanda et Miti-Mulungu) sélectionnées sur base de leur accessibilité par rapport à la ville de Bukavu et leur accessibilité pour la population visée car la distance entre le domicile de nourrissons et les structures de santé est inférieure à 5 km pour une grande proportion de la population de ces aires de santé. La présente étude s'est déroulée en janvier 2017.

3.1. Processus de recrutement des enfants et paramètres étudiés

Après consentement informé des parents, les nourrissons âgés de 4-7 mois des villages ciblés ont été identifiés par les relais communautaires et inscrits dans le registre avant d'être orientés de façon systématique vers le centre de santé pour l'examen clinique et le prélèvement des selles. Pour assurer une représentativité de la population de la ZS, 25-30 enfants ont été sélectionnés par villages de chaque aire de santé ciblée.

Le nourrisson était éligible s'il remplissait les critères : âge, allaitement maternel, poids de naissance >2500g et s'il fréquentait régulièrement la consultation préscolaire. Etaient exclus, les nourrissons souffrant des pathologies chroniques (cardiopathies, Infection à VIH, malformation congénitale), les nourrissons nés avec faible poids de naissance, nourris exclusivement au lait artificiel depuis la naissance et les jumeaux.

Pour chaque ménage, les données socio-démographiques (statut marital, niveau d'instruction et profession des parents) ainsi que les données sur l'hygiène (source d'eau, toilettes hygiéniques, lavage des mains) ont été collectées.

Pour chaque nourrisson, les paramètres suivants (âge, sexe, poids de naissance, poids, taille, périmètre brachial, type d'alimentation, morbidité dans les deux semaines) ont été collectés.

3.2. Procédures de laboratoire: Calprotectine Fécale (FC)

Les bocaux en plastique, propres et exempt de toute contamination d'huile ou de boue étaient distribués aux parents la veille du jour de la visite. Les relais communautaires ainsi que les parents étaient préalablement instruits sur la collecte des selles du matin en évitant toute contamination de l'échantillon et du bocal de collecte. Les échantillons de selles étaient recueillis par le technicien de laboratoire, conservés dans des boîtes isothermes et directement analysés au niveau du centre de santé le jour même de la visite.

L'appareil BÜHLMANN Quantum Blue ® Calprotectin Extended a été utilisé pour le dosage de la calprotectine fécale.

3.3. Définitions opérationnelles

Le poids, la taille en position couchée, les périmètres branchial et crânien ont été mesurés respectivement à l'aide d'une balance mécanique suspendue SECA, modèle 310, précision 50g, d'une toise en bois (précision 0.5cm) et le mètre-ruban. Les indices Poids -Taille, Taille-Age , et Poids-Age inférieur ou égal à -2 Z-score sur les courbes de l'OMS définissaient respectivement l'émaciation, le retard de croissance staturale et l'hypotrophie.

L'inflammation intestinale suggérant la présence de l'entéropathie environnementale a été définie par une concentration de calprotectine fécale supérieure ou égale à 250 $\mu\text{g/g}$ et 150 $\mu\text{g/g}$ respectivement pour les nourrissons âgés de moins de 6 mois et de plus de 6 mois[64][65][66].

3.4. Analyses statistiques

Le volet descriptif de différentes variables est présenté sous forme des proportions, des pourcentages, moyennes avec écart-type ou des médianes avec espaces interquartiles (EIQ). Pour l'analyse des données, nous avons utilisé le logiciel STATA version 14 et Anthro version 3.2.2 pour le calcul des indices anthropométriques. Pour la comparaison des médianes, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney. Le seuil de signification p a été fixé à 0.05.

3.5. Considération éthique

L'approbation éthique a été accordée par le Comité d'Ethique de l'Université Catholique de Bukavu en République Démocratique du Congo. Les parents ont été au préalable informés explicitement du but de l'étude et du fait que la participation à cette étude était volontaire. Les parents de tous les nourrissons ont aimablement fourni le consentement écrit et pour garantir la confidentialité, les données ont été analysées de façon anonyme.

IV. RESULTATS

Au total, 240 nourrissons ont été inclus dans l'étude parmi lesquels 125(52%) étaient de sexe féminin. La moyenne d'âge était de $5,6 \pm 0,7$ et la médiane 5,6 (4 - 7) mois. 17,1% de nourrissons avaient un ralentissement de croissance staturale, 6,7 % avaient une insuffisance pondérale et 1,7 % présentaient une émaciation. L'inflammation intestinale suggestive d'entéropathie environnementale et définie par une calprotectine fécale élevée pour l'âge a été retrouvée chez 46 nourrissons sur 240 soit 19,7%. La moyenne et la médiane de calprotectine fécale était respectivement de $119,3 \pm 92,3$ et de 87 ($36,5 - 192$) $\mu\text{g/g}$ de selles. 61,7% vivaient dans les ménages ayant accès à une source aménagée d'eau potable et 38,5 % avaient des toilettes hygiéniques et 42,6% avaient des pratiques appropriées en matière de lavage des mains (Tableau 1).

Tableau 1. Paramètres socio-démographiques, anthropométriques, nutritionnels et biologiques de la population d'étude.

Variables	N (%) 240(100%)	Moyenne \pm DS
Sexe		
Féminin	125 (52)	
Masculin	115 (48)	
Age		$5,6 \pm 0,7$
< 6 mois	97 (48,5)	
≥ 6 mois	103 (51,5)	
Poids de naissance (g)		$3270 \pm 30,1$
Poids (kg)		$7,1 \pm 0,6$
Taille (cm)		$63,8 \pm 0,16$
Périmètre brachial (cm)		$132 \pm 0,71$
Périmètre crânien (cm)		$43,3 \pm 0,09$
	P//A	$-0,40 \pm 0,07$
	P//T	$0,37 \pm 0,08$
	T//A	$-0,97 \pm 0,07$
Etat nutritionnel		
Retard de croissance staturale	41 (17,1)	
Hypotrophie	16 (6,7)	
Émaciation	4 (1,7)	
Statut marital des parents		
Marié	222 (92,5)	
Séparés	18 (7,5)	
Type de mariage		
Monogame	147 (61,8)	
Polygame	91 (38,2)	
Niveau d'instruction des parents		
Pas d'études ou Primaire	178 (74,2)	
Secondaire ou supérieur	62 (25,8)	
Source d'eau		
Aménagée(robinet)	148 (61,7)	
Non aménagée (source, eau de pluie)	92 (38,3)	
Antécédent de malnutrition dans la fratrie		
Oui	15 (6,3)	
Non	225 (93,7)	
Prophylaxie anti-palustre par MIILDA		
Oui	217 (90,8)	
Non	22 (9,2)	
Calprotectine fécale définissant une inflammation intestinale		$119,5 \pm 92,3$
Oui	46 (19,7)	
Non	194 (80,3)	

Tableau 2. Calprotectine fécale et des paramètres socio-démographiques, anthropométriques des nourrissons constituant la population d'étude.

Le tableau 2 montre que la médiane de calprotectine n'était pas significativement différente entre les catégories constituées par les paramètres : âge, sexe, statut marital des parents, type de mariage, source d'eau de boisson aménagée, antécédent de malnutrition dans la fratrie, et l'usage des moustiquaires imprégnées d'insecticides pour la prophylaxie anti palustre.

Variables	Calprotectine fécale Médiane (EIQ) (μ g/g)	P
Sexe		
Féminin	94 (36 - 193)	0,70
Masculin	80 (37- 185)	
Age		
<6 mois	108 (55 - 212)	0,82
\geq 6 mois	103 (66 - 223)	
Statut marital des parents		
Marié	88,5(36-193)	0,55
Séparés	71,1 (39-163)	
Type de mariage		
Monogame	95(36 -196)	0,3
Polygame	77 (37-175)	
Niveau d'instruction des parents		
Pas d'étude ou Primaire	94 (38 – 203)	0,21
Secondaire ou supérieur	74 (34 – 145)	
Source d'eau		
Aménagée(robinet)	93,5(36,5-205)	0,49
Non aménagée (source, eau de pluie)	75,5 (36,5-162)	
Antécédent de malnutrition dans la fratrie		
Oui	98 (39-214)	0,6
Non	87 (36-185)	
Prophylaxie anti-palustre par moustiquaires		
Oui	84 (36-182)	0,27
Non	109 (54-223)	
Inflammation intestinale suggestive d'entéropathie environnementale, définie par une calprotectine élevée pour l'âge		
Oui	300 (244 -300)	< 0,0005
Non	68 (33-108)	

Tableau 3. Calprotectine fécale et types d'alimentation des nourrissons constituant la population d'étude.

55 sur 240 (22,9%) nourrissons de la présente étude étaient sous allaitement maternel exclusif. La diversification alimentaire était faite avant trois mois d'âge chez 38,9 % des nourrissons diversifiés. Comparés aux nourrissons avec une alimentation déjà diversifiée, les nourrissons sous allaitement maternel exclusif avaient une médiane de calprotectine fécale significativement plus élevée. L'âge de diversification n'influençait pas significativement la calprotectine fécale (Tableau 3).

Variables	N(%) 240 (100%)	Moyenne ± DS (mois)	Calprotectine fécale Médiane (EIQ) (μ g/g)	P
Allaitement maternel exclusif	55(22,9)		108 (40-245)	0,03
Allaitement maternel et compléments	185(77,1)		79(34-156)	
Age de la diversification alimentaire		3,2 ± 0,12		
< 3 mois	72(38,9)		82(35-175)	0,69
3-6 mois	113(61,1)		108(40-234)	

Tableau 4. Calprotectine fécale et paramètres cliniques de la population d'étude.

Les parents ont rapporté que 90 % des nourrissons de notre étude avaient présenté une symptomatologie de maladie les deux semaines précédant notre enquête. Aucune symptomatologie n'avait influencé statistiquement la calprotectine fécale, même si la médiane de celle-ci est plus élevée chez les nourrissons qui avaient présenté des diarrhées, des vomissements et des coliques abdominales.

Variables	Groupe entier N(%) 240 (100%)	Calprotectine fécale Médiane (EIQ) μ g/g		P
		Présente	Absente	
Morbidité < 2 semaines	216 (90)	87,5 (36,5-188)	74 (36,5-223,5)	0,84
Diarrhée	96(40)	96,5(51,5-197,5)	77,5 (33-173,5)	0,06
Vomissement	49(20,4)	80(30-185)	87 (39-196)	0,33
Coliques abdominales	86(35,8)	98(34-175)	79,5(37-207)	0,79
Fièvre	109(45,4)	80(36-160)	89(37-221)	0,41
Toux	140(58,3)	88,5(39,5-196)	80,5(36-156)	0,55
Rhinorrhée	157(65,4)	85(35-175)	94(39-232)	0,52
Eruptions cutanées	89(37,1)	97(41-175)	80(36-207)	0,80

Tableau 5. Calprotectine fécale en fonction de l'état nutritionnel des nourrissons.

Les nourrissons en ralentissement de croissance staturale, en insuffisance pondérale et émaciés avaient une médiane de calprotectine fécale plus élevée comparés aux nourrissons avec une croissance staturale et pondérale normale pour l'âge selon les normes d'OMS mais la différence n'est pas statistiquement significative. (Tableau 5)

Variables	N (%) 240(100%)	Calprotectine fécale Médiane (EIQ) µg/g		P
		Présent	Absent	
Statut nutritionnel				
Retard de croissance staturale	41(17,1)	107 (32-223)	82(37 -165)	0,48
Hypotrophie	16(6,7)	103(42- 249,5)	83,5(36-188)	0,45
Émaciation	4 (1,7)	300 (300- 300)	85,5(36-181)	0,10

V. DISCUSSION.

5.1. Fréquence de l'inflammation intestinale suggestive de l'entéropathie environnementale.

Dans la présente étude, l'inflammation intestinale a été retrouvée chez 19,7% des nourrissons. La prévalence de cette inflammation intestinale caractéristique de l'entéropathie environnementale chez les enfants est variable selon les études faites dans diverses régions du monde. Cependant, l'entéropathie environnementale serait plus fréquente dans les pays à faible et moyen revenus[67][68]. Cette faible fréquence de l'inflammation intestinale dans notre étude pourrait s'expliquer par le taux d'allaitement maternel élevé des nourrissons constituant notre population d'étude.

La médiane de calprotectine fécale était de 87 µg/g chez les nourrissons de 4-7 mois en bonne santé apparente. Comparée à la calprotectine fécale retrouvée dans les études chez les nourrissons de moins de 7 mois, la calprotectine fécale dans notre étude est inférieure à celle de 278 µg/g décrite en Ouganda dans le milieu urbain[66], à celles de 217,9 µg/g et 420 µg/g retrouvées respectivement en milieu urbain[65] et rural [69] en Chine ; cependant elle est proche au 79 µg/g décrite en Norvège [70].

En effet, une controverse sur la valeur élevée de calprotectine fécale chez les enfants de moins de 4 ans existe dans la littérature mais tous les auteurs s'accordent que la calprotectine fécale est élevée à la naissance et diminue progressivement avec l'âge jusqu'atteindre les valeurs des adultes vers l'âge de 4 ans[70][71]. Dans la littérature, on décrit divers possibles mécanismes tendant à expliquer une calprotectine fécale élevée chez les jeunes nourrissons comparés aux enfants et aux adultes. Il existe une immaturité de l'immunité adaptative de l'intestin chez les jeunes nourrissons et l'un des mécanismes de maturation serait une migration transépithéliale accrue des granulocytes ou des macrophages augmentant ainsi l'excrétion de la calprotectine dans les selles[72][73]. En plus, une augmentation de la perméabilité intestinale a été décrite chez les nouveau-nés dans certaines études[74] [75][76]. Le taux basal élevé de calprotectine fécale pourrait être lié à l'établissement du microbiote intestinal et à une réponse aux antigènes alimentaires qui aident à prévenir les infections associées à des germes entéropathogènes, à bloquer les interactions entre les agents pathogènes et les cellules hôtes et participent à la tolérance alimentaire [24][77][78][79][80]. Il existerait donc une inflammation intestinale physiologique de bas grade et infra clinique chez les jeunes nourrissons qui expliquerait une migration transépithéliale des granulocytes[81].

Une faible médiane de calprotectine fécale a été retrouvée dans notre étude mais reste supérieure à celle de nourrissons de plus d'un an et des adultes.

5.2. Calprotectine fécale et allaitement maternel

Dans la présente étude, la calprotectine fécale est significativement plus élevée chez les nourrissons sous allaitement maternel exclusif comparés à ceux sous une alimentation diversifiée. Ceci concorde avec la majorité des résultats de la littérature [82][83][84][85]. La calprotectine fécale élevée retrouvée dans plusieurs études chez les jeunes nourrissons allaités au sein maternel [24][86][65] jouerait une rôle protecteur de l'intestin immature vis-à-vis des agressions diverses de la muqueuse intestinale jusqu'à la maturation et la régulation avec l'âge des protéines de la jonction serrée épithéliale et d'autres facteurs de l'immunité intestinale [65][82][87].

Cependant, le fait que la calprotectine fécale, utilisée comme marqueur de l'inflammation intestinale, soit plus élevée chez les nourrissons allaités au sein crée un phénomène paradoxal dans la littérature. Certains auteurs ont décrit des théories pour expliquer ce phénomène paradoxal mais avec moult controverses dans les résultats trouvés. L'allaitement maternel contiendrait des facteurs qui diminueraient la perméabilité intestinale en assurant la maturation progressive des tight junctions entre les entérocytes tandis que l'allaitement artificiel qui en est dépourvu entraînerait de lésions de la muqueuse intestinale expliquant une augmentation de la perméabilité intestinale[88][89]. Se basant sur la théorie de la perméabilité intestinale, le taux de calprotectine fécale serait donc moins élevé chez les nourrissons sous allaitement maternel. L'alimentation artificielle précoce des nourrissons entraînerait une migration transépithéliale accrue de neutrophiles, cellules dont la calprotectine représente environ 60 % des protéines cytoplasmiques [81].

5.3. Calprotectine fécale , entéropathie environnementale et retard de croissance.

La calprotectine fécale est élevée chez les nourrissons en retard de croissance staturale constituant notre population d'étude. En effet ,plusieurs marqueurs dosables dans les selles notamment la calprotectine, la myéloperoxydase, la néoptérine sont utilisés comme marqueurs non invasifs de l'inflammation intestinale chez l'enfant dans diverses études [69][90][91][92][93][94] qui ont décrit l'inflammation intestinale dans l'entéropathie environnementale qui serait à la base du retard de croissance staturale chez l'enfant.

Malgré l'association retrouvée entre l'élévation de la calprotectine fécale et le retard de croissance staturale chez les enfants [69] , il n'existe pas de consensus dans la littérature sur le fait que cette calprotectine fécale élevée chez les nourrissons, comme marqueur d'une inflammation intestinale, serait associée à un effet délétère sur la croissance staturale et/ou pondérale ou aurait plutôt un rôle protecteur de la muqueuse intestinale vis-à-vis de diverses agressions notamment microbiennes chez les jeunes nourrissons[95][23][96][80].

Le mécanisme à l'origine du retard de croissance staturale reste multifactoriel, l'entéropathie environnementale serait l'un de ces facteurs malgré la controverse dans la littérature[95][97][98]. En effet, l'entéropathie environnementale est une inflammation chronique de l'intestin grêle caractérisée par une atrophie des villosités ,une hyperplasie des cryptes et une augmentation de la perméabilité intestinale[99]. L'inflammation intestinale chronique serait liée à un cercle vicieux entretenu entre la sous -nutrition, les infections et les mauvaises conditions d'environnement.

Chez les jeunes nourrissons vivant les pays à revenus faibles ou intermédiaires, ce cercle vicieux serait dû à une exposition continue à la contamination oro-fécale par les microbes, les infections intestinales répétées qu'ils entraînent et à la sous-nutrition[100]. En effet, dans l'entéropathie environnementale , il a été décrit une prolifération bactérienne accrue dans l'intestin grêle conduisant à une inflammation locale et une altération de la barrière intestinale, des fonctions de digestion et d'absorption des nutriments[101][102] [103][104]. Par ailleurs, l'inflammation intestinale chez les enfants définie entre autre par la calprotectine fécale élevée a été associée à un taux bas d'IGF-1 chez les nourrissons de moins de 18 mois au Zimbabwe [105], à un faible indice taille par rapport à l'âge au Kenya et au Bangladesh [106][107].

VI. CONCLUSION

La calprotectine fécale reste un marqueur non invasif de l'inflammation intestinale mais l'interprétation de sa variation chez les nourrissons de moins de 3 ans demeure aussi débattue dans la littérature. Le développement du système immunitaire, influencé par le microbiote intestinal, l'alimentation et l'environnement, expliquerait cette variation importante de calprotectine fécale chez les enfants. L'inflammation intestinale chronique est le soubassement de l'entéropathie environnementale, une entité subclinique incriminée dans la survenue du retard de croissance staturale ou malnutrition chronique et ses multiples complications à court et à long terme.

La présente étude constitue un travail préliminaire dans la compréhension de la relation calprotectine fécale -inflammation intestinale -entéropathie environnementale et retard de croissance staturale dans la région du Sud-Kivu. En se basant sur la calprotectine fécale mesurée dans cette étude, l'inflammation intestinale s'installerait précocement dans un groupe de jeunes nourrissons dans notre milieu et pourrait expliquer la survenue précoce d'un ralentissement de la croissance staturale.

Cela étant, dans la prévention et la prise en charge du retard de croissance staturale et de l'entéropathie environnementale et la compréhension des facteurs intervenant dans la variabilité de la calprotectine fécale chez les enfants en général et les nourrissons en particuliers, plusieurs pistes d'études pourraient être explorées dans nos milieux :

- ❖ La modification des habitudes alimentaires lors de la diversification alimentaire,
- ❖ L'assainissement de milieux de vie et l'amélioration de conditions d'hygiène,
- ❖ L'usage des saccharomyces,
- ❖ Les probiotiques,
- ❖ La transplantation fécale,
- ❖ L'usage des antibiotiques,
- ❖ L'analyse du microbiote intestinal, etc...

VII. BIBLIOGRAPHIE

- [1] OMS, 'le retard de croissance', Geneva , Switzerland, 2012.
- [2] W. B. United Nations' Children's Fund, World Health Organization, 'Joint Child Malnutrition Estimates—Levels and Trends', Geneva , Switzerland, 2018.
- [3] WHO african region, 'Nutrition in the WHO african region', Brazzaville, 2017.
- [4] M. Library, 'Congo , Dem . Rep . - Enquête Démographique et de Santé 2013-2014', pp. 1–12, 2017.
- [5] L. M. Locks *et al.*, 'Infant Nutritional Status and Markers of Environmental Enteric Dysfunction are Associated with Midchildhood Anthropometry and Blood Pressure in Tanzania', *J. Pediatr.*, vol. 187, pp. 225-233.e1.
- [6] R. A. Sue McKay, Estelle Gaudier, David I. Campbell, Andrew M. Prentice, 'Environmental enteropathy: new targets for nutritional interventions', *Int. Health*, vol. Volume 2, no. Issue 3, p. Pages 172–180, 2010.
- [7] S. Park, H. Choi, H. Yang, and J. Yim, 'Effects of zinc supplementation on catch-up growth in children with failure to thrive', *Nutr. Res. Pract.*, vol. 11, no. 6, pp. 487–491, 2017.
- [8] A. C. and N. W. Winter Maxwell Thayer, 'Effects of deworming on child and maternal health : a literature review and meta-analysis', *BMC Public Health*, vol. 17, no. Suppl 4, p. 830, 2017.
- [9] M. Umeta, C. E. West, J. Haidar, P. Deurenberg, and J. G. A. J. Hautvast, 'Zinc supplementation and stunted infants in Ethiopia : a randomised controlled trial', *Lancet*, vol. 355, pp. 2021–2026, 2000.
- [10] V. A. Welch *et al.*, 'Articles Mass deworming to improve developmental health and wellbeing of children in low-income and middle-income countries : a systematic review and network meta-analysis', *Lancet Glob. Heal.*, vol. 5, no. 1, pp. e40–e50, 2017.
- [11] P. V Phu *et al.*, 'A Six-Month Intervention with Two Different Types of Micronutrient-Fortified Complementary Foods Had Distinct Short- and Long-Term Effects on Linear and Ponderal Growth of Vietnamese Infants 1 – 3', *J. Nutr.*, pp. 1735–1740, 2012.
- [12] P. H. Donnen Philippe, Michèle Dramaix Wilmet, Philippe J. Goyens, Ghislain Bisimwa Balaluka, W Wakilongo, S Matata, 'A randomised, placebo-controlled trial of the effect of zinc supplementation given either to infants, either to lactating mothers on infant's growth and morbidity in rural Democratic Republic of Congo (DRC)', 2000.
- [13] G. Bisimwa *et al.*, 'Randomized controlled trial of the effectiveness of a soybean-maize-sorghum-based ready-to-use complementary food paste on infant growth in South Kivu, Democratic Republic of Congo', *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 95, no. 5, pp. 1157–1164, 2012.
- [14] A. J. Prendergast and J. H. Humphrey, 'The stunting syndrome in developing countries', *Paediatr. Int. Child Health*, 2014.
- [15] J. H. Humphrey, 'Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing', *The Lancet*. 2009.
- [16] G. T. Keusch *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.
- [17] F. M. Ngure, B. M. Reid, J. H. Humphrey, M. N. Mbuya, G. Pelto, and R. J. Stoltzfus, 'Water, sanitation, and hygiene (WASH), environmental enteropathy, nutrition, and early child development: Making the links', *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2014.

- [18] S. Salvatore, B. Hauser, T. Devreker, S. Arrigo, and Y. Vandenplas, 'Chronic enteropathy and feeding in children: An update', *Nutrition*. 2008.
- [19] D. Brasseur, P. Goyens, and H. L. Vis, '[Enzymes and histology of the intestinal mucosa of breast-fed African infants].', *Ann. Pediatr. (Paris)*, 1992.
- [20] R. Tonglet, Katulanya-Isu, F. Chiabrera, M. Dramaix, and P. Hennart, 'Pattern of attained growth in 0 to 5 year-old children from Kivu (Zaire)', *Ecol. Food Nutr.*, vol. 26, no. 3, pp. 215–226, Oct. 1991.
- [21] M. Dhs, 'République Démocratique du Congo Enquête Démographique et de Santé Rapport préliminaire', 2014.
- [22] institut national de Statistique, 'Congo, Dem. Rep. - Enquête Par Grappes à Indicateurs Multiples 2010', 2014.
- [23] B. Lisowska, 'Changes in Physiology and Pathophysiology of Calprotectin Excretion from Neonate to Adult', *J. Mol. Biomark. Diagn.*, vol. 06, no. 03, 2015.
- [24] F. Savino, E. Castagno, R. Calabrese, S. Viola, R. Oggero, and R. Miniero, 'High faecal calprotectin levels in healthy, exclusively breast-fed infants', *Neonatology*, 2010.
- [25] W. H. O. Conceptual, 'Childhood Stunting : Context , Causes and Consequences WHO Conceptual framework', vol. 9, no. September, 2013.
- [26] R. J. Crane and J. A. Berkley, 'Europe PMC Funders Group Environmental enteric dysfunction : An overview', *Food Nutr Bull.*, vol. 36, no. 1 0, pp. S76–S87., 2015.
- [27] K. Watanabe and W. A. Petri, 'EBioMedicine Environmental Enteropathy : Elusive but Significant Subclinical Abnormalities in Developing Countries', *EBIOM*, vol. 10, pp. 25–32, 2016.
- [28] J. Yu *et al.*, 'Environmental Enteric Dysfunction Includes a Broad Spectrum', *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 2, no. 2, pp. 158-174.e1, 2016.
- [29] A. I. Fagerhol MK, Dale I, 'Release and quantification of leukocyte derived protein (L1)', *Scand J Haematol*, vol. 24, pp. 393–8, 1980.
- [30] A. G. RØseth, M. K. Fagerhol, E. Aadland, and H. Schjønsby, 'Assessment of the Neutrophil Dominating Protein Calprotectin in Feces: A Methodologic Study', *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 27, no. 9, pp. 793–798, Jan. 1992.
- [31] L. Orivuori *et al.*, 'High level of fecal calprotectin at age 2 months as a marker of intestinal inflammation predicts atopic dermatitis and asthma by age 6 Experimental Allergy', *Clin. Exp. Allergy*, vol. 45, no. September 2014, pp. 928–939, 2015.
- [32] D. Suisse, 'Calprotectine fécale : une utilité pour le généraliste ?', pp. 12–15, 2016.
- [33] U. L. Fagerberg, L. Lööf, U. Myrdal, L. O. Hansson, and Y. Finkel, 'Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms', *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 40, no. 4, pp. 450–455, 2005.
- [34] Gary B. HUFFNAGLE and Mairi C., *Gastro-intestinal microbiota and regulation of the immune system*. Texas, USA: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data A, 2008.
- [35] J.-P. Kraehenbuhl and M. R. Neutra, 'Epithelial M Cells: Differentiation and Function', *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 301–332, Nov. 2000.
- [36] P. O. Battisti and P. O. Battisti, 'Pathologie pédiatrique', 2008, pp. 1–235.
- [37] M. Tanaka and J. Nakayama, 'Allergology International Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life', *Allergol. Int.*, vol. 66, no. 4, pp. 515–522, 2017.
- [38] J. V. Ihekweazu, D, 'Development of the Pediatric Gut', *Am J Med Sci*, vol. 356, pp. 413–423, 2018.

- [39] M. J. Gosalbes, S. Llop, and Y. Vall, 'Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants Experimental Allergy', *Clin. Exp. Allergy*, no. 43, pp. 198–211, 2012.
- [40] E. Jime and J. M. Rodríguez, 'Is meconium from healthy newborns actually sterile?', *Res. Microbiol.*, vol. 159, pp. 187–193, 2008.
- [41] M. E. Perez-muñoz, M. Arrieta, A. E. Ramer-tait, and J. Walter, 'A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses : implications for research on the pioneer infant microbiome', *Microbiome*, vol. 5, pp. 1–19, 2017.
- [42] R. C. Robertson, A. R. Manges, B. B. Finlay, and A. J. Prendergast, 'The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond', *Trends Microbiol.*, vol. 27, no. 2, pp. 131–147, 2019.
- [43] M. P. Francino, 'Early Development of the Gut Microbiota and Immune Health', *Pathogens*, vol. 4, pp. 769–790, 2014.
- [44] T. Yatsunenko *et al.*, 'Human gut microbiome viewed across age and geography', *Nature*, vol. 486, no. 7412, 2012.
- [45] S. Tamburini, N. Shen, H. C. Wu, and J. C. Clemente, 'The microbiome in early life: Implications for health outcomes', *Nat. Med.*, vol. 22, no. 7, pp. 713–722, 2016.
- [46] Y. M. Sjögren, M. C. Jenmalm, M. F. Böttcher, B. Björkstén, and E. Sverremark-Ekström, 'Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age', *Clin. Exp. Allergy*, vol. 39, no. 4, pp. 518–526, 2009.
- [47] Y. M. Sjögren, M. C. Jenmalm, M. F. Böttcher, B. Björkstén, and E. Sverremark-Ekström, 'Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age', *Clin. Exp. Allergy*, vol. 39, no. 4, pp. 518–526, Apr. 2009.
- [48] A. M. Platt and A. M. I. Mowat, 'Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine', *Immunol. Lett.*, vol. 119, no. 1–2, pp. 22–31, 2008.
- [49] S. Romagnani, 'Regulation of the T cell response', *Clin. Exp. Allergy*, vol. 36, no. 11, pp. 1357–1366, Nov. 2006.
- [50] H. Groux *et al.*, 'A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis', *Nature*, vol. 389, no. 6652, pp. 737–742, 1997.
- [51] S. Romagnani, 'The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: Missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?', *Immunology*, vol. 112, no. 3, pp. 352–363, 2004.
- [52] M. Akdis, 'Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more', *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 18, no. 6, pp. 738–744, 2006.
- [53] F. Meiler, S. Klunker, M. Zimmermann, C. A. Akdis, and M. Akdis, 'Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors', *Allergy*, vol. 63, no. 11, pp. 1455–1463, Nov. 2008.
- [54] T. Von der Weid, C. Bulliard, and E. J. Schiffrin, 'Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4+ T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor β and interleukin-10', *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 8, no. 4, pp. 695–701, 2001.
- [55] T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman, 'Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.', *J. Immunol.*, vol. 136, no. 7, pp. 2348 LP – 2357, Apr. 1986.

- [56] P. Parronchi *et al.*, 'IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones.', *J. Immunol.*, vol. 149, no. 9, pp. 2977 LP – 2983, Nov. 1992.
- [57] T. F. Gajewski and F. W. Fitch, 'Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones.', *J. Immunol.*, vol. 140, no. 12, pp. 4245 LP – 4252, Jun. 1988.
- [58] K. Oboki, T. Ohno, H. Saito, and S. Nakae, 'Th17 and allergy', *Allergol. Int.*, vol. 57, no. 2, pp. 121–134, 2008.
- [59] A. K. Abbas, 'Die and let live: Eliminating dangerous lymphocytes', *Cell*, vol. 84, no. 5, pp. 655–657, 1996.
- [60] K. M. Murphy and B. Stockinger, 'Effector T cell plasticity: Flexibility in the face of changing circumstances', *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 8, pp. 674–680, 2010.
- [61] S. Nakae *et al.*, 'Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses', *Immunity*, vol. 17, no. 3, pp. 375–387, 2002.
- [62] C. A. Akdis and M. Akdis, 'Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells', *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 123, no. 4, pp. 735–746, 2009.
- [63] G. A. W. Rook and L. R. Brunet, 'Microbes, immunoregulation, and the gut', *Gut*, vol. 54, no. 3, pp. 317–320, 2005.
- [64] F. Davidson and R. J. Lock, 'Paediatric reference ranges for faecal calprotectin : a UK study', *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 54, no. 2, pp. 214–218, 2017.
- [65] F. Li *et al.*, 'Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months', *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–12, 2015.
- [66] E. Hestvik *et al.*, 'Faecal calprotectin concentrations in apparently healthy children aged 0-12 years in urban Kampala, Uganda: A community-based survey', *BMC Pediatr.*, vol. 11, no. 1, p. 9, 2011.
- [67] J. H. Humphrey, 'Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing', *Lancet*, vol. 374, no. 9694, pp. 1032–1035, 2009.
- [68] V. Owino, T. Ahmed, M. Freemark, and P. Kelly, 'Environmental Enteric Dysfunction and Growth Failure / Stunting in Global Child Health', *Paediatrics*, vol. 138, no. 6, 2016.
- [69] J. R. Liu *et al.*, 'Fecal calprotectin levels are higher in rural than in urban Chinese infants and negatively associated with growth', *BMC Pediatr.*, vol. 12, no. 1, p. 1, 2012.
- [70] J. Rugtveit and M. K. Fagerhol, 'Age-dependent variations in fecal calprotectin concentrations in children [2]', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2002.
- [71] M. Garg *et al.*, 'Age-dependent variation of fecal calprotectin in cystic fibrosis and healthy children', *J. Cyst. Fibros.*, vol. 16, no. 5, pp. 631–636, 2017.
- [72] E. Olafsdottir, L. Aksnes, G. Fluge, and a Berstad, 'Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children.', *Acta Paediatr.*, 2002.
- [73] F. Campeotto *et al.*, 'Fecal calprotectin: Cutoff values for identifying intestinal distress in preterm infants', *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 48, no. 4, pp. 507–510, 2009.
- [74] C. Rougé *et al.*, 'Fecal calprotectin excretion in preterm infants during the neonatal period.', *PLoS One*, 2010.

- [75] A. C. Nissen, C. E. Van Gils, P. P. Menheere, A. M. Van Den Neucker, M. A. Van Der Hoeven, and P. P. Forget, 'Fecal calprotectin in healthy term and preterm infants [2]', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2004.
- [76] R. M. van Elburg, W. P. F. Fetter, C. M. Bunkers, and H. S. A. Heymans, 'Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age.', *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, vol. 88, no. 1, pp. F52–F55, 2003.
- [77] N. Kapel, F. Campeotto, N. Kalach, M. Baldassare, M. J. Butel, and C. Dupont, 'Faecal calprotectin in term and preterm neonates', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2010.
- [78] L. T. Weaver, M. F. Laker, and R. Nelson, 'Intestinal permeability in the newborn', *Arch. Dis. Child.*, vol. 59, no. 3, pp. 236–241, 1984.
- [79] I. Šplíchal, M. K. Fagerhol, I. Trebichavský, A. Šplíchalová, and J. Schulze, 'The effect of intestinal colonization of germ-free pigs with *Escherichia coli* on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages', *Immunobiology*, vol. 209, no. 9, pp. 681–687, 2005.
- [80] J. Z. Liu *et al.*, 'Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances salmonella growth in the inflamed gut', *Cell Host Microbe*, vol. 11, no. 3, pp. 227–239, 2012.
- [81] A. Berstad, G. Arslan, G. Folvik, 'Relationship between Intestinal Permeability and Calprotectin Concentration in Gut Lavage Fluid', *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 35, no. 1, pp. 64–69, 2000.
- [82] S. M. Dorosko, T. MacKenzie, and R. I. Connor, 'Fecal Calprotectin Concentrations Are Higher in Exclusively Breastfed Infants Compared to Those Who Are Mixed-Fed', *Breastfeed. Med.*, 2008.
- [83] F. Li, J. Ma, S. Geng, J. Wang, F. Ren, and X. Sheng, 'Comparison of the different kinds of feeding on the level of fecal calprotectin', *Early Hum. Dev.*, vol. 90, no. 9, pp. 471–475, 2014.
- [84] R. Moussa, A. Khashana, N. Kamel, and S. E. Elsharqawy, 'Fecal calprotectin levels in preterm infants with and without feeding intolerance', *J. Pediatr. (Rio. J.)*, 2016.
- [85] M. Asgarshirazi, M. Shariat, F. Nayeri, H. Dalili, and A. Abdollahi, 'Comparison of fecal calprotectin in exclusively breastfed and formula or mixed fed infants in the first six months of life', *Acta Med. Iran.*, vol. 55, no. 1, pp. 53–58, 2017.
- [86] F. Campeotto *et al.*, 'Fecal calprotectin: Cutoff values for identifying intestinal distress in preterm infants', *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2009.
- [87] M. Groer, T. Ashmeade, A. Louis-Jacques, J. Beckstead, and M. Ji, 'Relationships of Feeding and Mother's Own Milk with Fecal Calprotectin Levels in Preterm Infants', *Breastfeed. Med.*, vol. 11, no. 4, pp. 207–212, 2016.
- [88] S. N. Taylor, L. A. Basile, M. Ebeling, and C. L. Wagner, 'Intestinal Permeability in Preterm Infants by Feeding Type: Mother's Milk Versus Formula', *Breastfeed. Med.*, vol. 4, no. 1, pp. 11–15, 2009.
- [89] N. Hayati, M. Kadim, I. Mangunatmadja, S. Soedibyo, E. B. Ifran, and H. A. Sjakti, 'Gut wall integrity in exclusively breastfed vs. formula-fed infants', *Paediatr. Indones. Orig. Artic.*, vol. 56, no. 4, pp. 199–204, 2016.
- [90] J. Dhaliwal *et al.*, 'Intestinal inflammation and impact on growth in children with cystic fibrosis', *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2015.
- [91] P. G. Lunn, C. A. Northrop-Clewes, and R. M. Downes, 'Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants', *Lancet*, 1991.

- [92] D. I. Campbell, G. McPhail, P. G. Lunn, M. Elia, and D. J. Jeffries, '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.
- [93] W. A. Petri, C. Naylor, and R. Haque, 'Environmental enteropathy and malnutrition: Do we know enough to intervene?', *BMC Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–5, 2014.
- [94] R. B. Canani *et al.*, 'Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice', *Dig. Liver Dis.*, 2004.
- [95] R. K. Campbell *et al.*, 'Environmental enteric dysfunction and systemic inflammation predict reduced weight but not length gain in rural Bangladeshi children', *Br. J. Nutr.*, vol. 119, no. 4, pp. 407–414, 2018.
- [96] K. M. Harper, M. Mutasa, A. J. Prendergast, J. Humphrey, and A. R. Manges, 'Environmental enteric dysfunction pathways and child stunting: A systematic review', *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–23, 2018.
- [97] S. Syed *et al.*, 'Environmental enteropathy in undernourished Pakistani children: Clinical and histomorphometric analyses', *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 98, no. 6, pp. 1577–1584, 2018.
- [98] C. M. George *et al.*, 'Enteric Infections in Young Children are Associated with Environmental Enteropathy and Impaired Growth', *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 23, no. 1, pp. 26–33, 2018.
- [99] K. Watanabe and W. A. Petri, 'Environmental Enteropathy: Elusive but Significant Subclinical Abnormalities in Developing Countries', *EBioMedicine*. 2016.
- [100] M. N. Kosek *et al.*, 'Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study', *EBioMedicine*, 2017.
- [101] J. R. Donowitz and W. A. Petri, 'Pediatric small intestine bacterial overgrowth in low-income countries', *Trends in Molecular Medicine*. 2015.
- [102] J. R. Donowitz *et al.*, 'Small intestine bacterial overgrowth and environmental enteropathy in Bangladeshi children', *MBio*, vol. 7, no. 1, pp. 1–7, 2016.
- [103] R. H. Kukuruzovic and D. R. Brewster, 'Small bowel intestinal permeability in Australian aboriginal children', *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2002.
- [104] P. Vonaesch, E. Morien, L. Andrianonimadana, H. Sanke, and J. Mbecko, 'Stunted childhood growth is associated with decompartmentalization of the gastrointestinal tract and overgrowth of oropharyngeal taxa', vol. 115, no. 36, pp. 8489–8498, 2018.
- [105] A. J. Prendergast *et al.*, 'Stunting is characterized by chronic inflammation in zimbabwean infants', *PLoS One*, 2014.
- [106] K. D. J. Jones *et al.*, 'Mesalazine in the initial management of severely acutely malnourished children with environmental enteric dysfunction: A pilot randomized controlled trial', *BMC Med.*, vol. 12, no. 1, 2014.
- [107] C. Naylor *et al.*, 'Environmental Enteropathy, Oral Vaccine Failure and Growth Faltering in Infants in Bangladesh', *EBioMedicine*, vol. 2, no. 11, pp. 1759–1766, 2015.